

# Biologický rozklad PVP v půdním prostředí

Bc. Ludmila Vaňharová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ludmila Vaňharová**  
Osobní číslo: **T13369**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologický rozklad polyvinylpyrrolidonu v půdním prostředí**

Zásady pro vypracování:

1. V rámci literární studie sumarizujte výsledky diplomových prací zabývajících se biologickým rozkladem polyvinylpyrrolidonu (PVP) z let 2010, 2011 a 2012. Doplňte stávající literární studie o nové poznatky z oblasti biologického rozkladu PVP.
2. V rámci experimentální práce proveďte testy biologické rozložitelnosti PVP v půdním prostředí. Na základě literárních údajů navrhnete a otestujete případné iniciátory biologického rozkladu.
3. Naměřená a vypočtená data zpracujte a dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Markéta Julinová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**15. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....VAŇHAROVÁ LUDMILA.....

Obor: .....102P-CHTM.....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....11.5.2015.....

.....Vaňharová.....



<sup>2)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k větší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá biologickým rozkladem polyvinylpyrrolidonu (PVP) v půdním prostředí. Testován byl vzorek polymeru PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\ 000\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , jeho možný biologický rozklad ale nebyl potvrzen. Pozorován byl také vliv adaptace půdního prostředí na kosubstrát (1-methyl-2-pyrrolidon, 1-oktyl-2-pyrrolidon, N-acetyl-L-fenylalanin, akrylamid) na biologický rozklad PVP. Pozitivní biodegradace PVP byla zjištěna pouze v případě adaptace prostředí na akrylamid, nicméně dosažené výsledky je nutno ještě experimentálně prověřit. Dalším tématem práce bylo testování biologické rozložitelnosti fólií připravovaných z polymerní směsi PVP s kyselinou polymléčnou (PLA) (50/50) a PVP/PLA/kosubstrát. Bylo zjištěno, že fólie z polymerní směsi PVP/PLA podléhaly v půdním a vodném prostředí s inokulem z aktivovaného kalu výrazné degradaci, nicméně k biologické degradaci během experimentů nedocházelo. Fólie s přidavkem kosubstrátů podléhaly biodegradaci pouze v rozsahu přidaného kosubstrátu.

Klíčová slova: půda, biodegradace, polyvinylpyrrolidon, kyselina polymléčná, 1-methyl-2-pyrrolidon, 1-oktyl-2-pyrrolidon, N-acetyl-L-fenylalanin, akrylamid

## **ABSTRACT**

This thesis deals with biodegradation of polyvinylpyrrolidone (PVP) in the soil environment. The tested sample was polymer PVP K15 ( $M_w$  10 000 Daltons), but its possible biodegradation has not been confirmed. There was studied the influence of on the cosubstrate adapted soil (1-methyl-2-pyrrolidone, 1-oktyl-2-pyrrolidone, N-acetyl-L-phenylalanine, acrylamide) on biodegradation of PVP. Positive biodegradation of PVP was detected only in case of soil adapted on acrylamide, however it is necessary to experimentally verified this results yet. Another topic of this thesis was testing the biodegradability of films prepared from a polymer blend of PVP and lactic acid (PLA) (50/50) and PVP/PLA/cosubstrate. It was found that the film of the polymer blend of PVP/PLA is distinctly degraded in the soil and aqueous medium inoculated by sludge, however there was no biological degradation registered. Films contained cosubstrates were biodegraded but only in the range of added cosubstrate.

Keywords: soil, biodegradation, polyvinylpyrrolidone, polylactic acid, 1-methyl-2-pyrrolidone, 1-octyl-2-pyrrolidone, N-acetyl-L-phenylalanine, acrylamide

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce paní Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA PVP</b> .....	<b>12</b>
<b>2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD</b> .....	<b>13</b>
2.1 BIOLOGICKÝ ROZKLAD POLYMERŮ.....	13
2.2 ZPŮSOBY TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI POLYMERŮ.....	14
2.2.1 Polymery nerozpustné ve vodě .....	14
2.2.2 Polymery rozpustné ve vodě .....	16
2.2.3 Normy pro testování biologické rozložitelnosti polymerů v půdě.....	17
2.2.4 Respirometr BI 2000 .....	18
<b>3 STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE BIOLOGICKÝM ROZKLADEM PVP</b> .....	<b>20</b>
3.1 TEORETICKÝ BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVP .....	20
3.2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD NEUPRAVENÝCH VZORKŮ PVP.....	21
3.2.1 Vodné prostředí s inokulem z aktivovaného kalu (AK) z městské ČOV; aerobního i anaerobního .....	21
3.2.2 Vodné prostředí s inokulem z AK z průmyslových ČOV, specifické mikrobiální kultury.....	22
3.2.3 Vodné prostředí s různými typy inokul půdy a půdy samotné.....	25
3.2.4 Biologický rozklad v prostředí mořské vody .....	26
3.3 VLIV KOSUBSTRÁTŮ NA BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVP .....	27
3.4 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PŘEDUPRAVENÝCH VZORKŮ PVP.....	29
3.5 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVP VE SMĚSÍCH .....	29
<b>4 SHRUTÍ LITERÁRNÍ REŠERŠE A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
5.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	35
5.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	36
5.3 POUŽITÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	38
5.4 METODA STANOVENÍ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ .....	39
5.5 METODA STANOVENÍ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU VE VODNÉM PROSTŘEDÍ S INOKULEM Z AK .....	40
5.6 OSTATNÍ STANOVENÍ.....	40
5.7 PŘÍPRAVA POLYMERŮNÍCH SMĚSÍ PVP/PLA .....	45
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>47</b>
<b>6 BIOLOGICKÝ ROZKLAD NEUPRAVENÉHO VZORKU PVP V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ</b> .....	<b>48</b>
6.1 SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍ AKTIVITY „JARNÍHO“ ODBĚRU PŮDY .....	48
6.2 VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI PVP V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ.....	51
<b>7 BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST PVP V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ ADAPTOVANÉM NA KOSUBSTRÁT</b> .....	<b>54</b>
<b>8 BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST SMĚSNÉHO POLYMERU PVP/PLA (50/50)</b> .....	<b>57</b>



8.1	SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍ AKTIVITY „PODZIMNÍHO“ ODBĚRU PŮDY.....	57
8.2	VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI SMĚSNÉHO POLYMERU PVP/PLA A PVP/PLA/KOSUBSTRÁT V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ.....	62
8.3	VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI SMĚSNÉHO POLYMERU PVP/PLA VE VODNÉM PROSTŘEDÍ S INOKULEM Z AK ČOV MALENOVICE .....	68
8.4	STUDIE VLASTNOSTÍ POLYMERNÍCH SMĚSÍ PVP/PLA A PVP/PLA/KOSUBSTRÁT .....	70
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>76</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>77</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>		<b>78</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>81</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>83</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>84</b>

## ÚVOD

Půdu lze definovat jako přírodní útvar, který vznikl vlivem reakcí mezi atmosférou a zemskou kůrou, tedy procesem zvětrávání zemské kůry a organických zbytků za působení půdotvorných faktorů. Tento dynamický a neustále se vyvíjející živý systém bývá popisován jako otevřený a vysoce heterogenní, nalezneme v něm jak fázi tuhou, tak i kapalnou a plynnou. Kapalnou fází představuje půdní voda (gravitační, kapilární), plynnou fází pak rozumíme půdní vzduch, v němž je obsažen převážně oxid uhličitý, méně pak kyslík, případně amoniak. Tuhou fází můžeme rozdělit do dvou skupin a to na organickou, která je tvořena huminy, huminovými kyselinami a fulvokyselinami. Zbylý anorganický podíl tvoří jílové minerály, oxidy a hydroxidy.<sup>1,2,3</sup>

Půda představuje životní prostředí pro edafon, fytoocenózu a umožňuje člověku ji obhospodařovat kulturními plodinami. Jednou z nejdůležitějších vlastností půdy, respektive její tenké svrchní vrstvy, pedosféry, je její úrodnost. Úrodnost lze popsat jako složitý celek specifických znaků ve vztahu k rostlinám a jejich výživě. Pro rostliny tedy musí půda zprostředkovat dostatek živin a vody. Podmínky ovlivňující úrodnost půdy ovlivňují navzájem také sebe, můžeme sem zařadit povětrnostní podmínky, teplotu, obsah půdní vody a vzduchu i kyselost půdy, a jiné. Měnit se také v menší míře mohou fyzikální vlastnosti půdy. Největší podíl na změnu vlastností půdy má člověk, který zahluje půdu organickými, anebo minerálními hnojivy a půdu mechanicky zpracovává. Některé látky mohou v půdě díky sorpčním vlastnostem přetrvávat i několik let. Z půdy se tak stává významný zdroj potenciálně rizikových látek, přičemž může docházet k narušení přirozeného koloběhu látek.<sup>1-3</sup>

Je potřeba si uvědomit, že půda představuje nejcennější přírodní bohatství každého státu. Je tedy nezbytné chránit půdu nejen pro současnost, ale i pro budoucí generace. Je známo, že centimetr krychlový půdy se vyvíjí desítky až stovky let. Zničen však může být v důsledku erozí, nebo ekologické katastrofy během několika minut.<sup>1-3</sup>

Jednou z potenciálně nebezpečných látek pro půdní prostředí by mohl být i polyvinylpyrrolidon (PVP). O jeho osudu v environmentu není známo mnoho informací, neboť je považován za látku biologicky inaktivní a netoxickou. PVP se dostává na čistírnu odpadních vod (ČOV) jako součást čisticích prostředků, léčiv, či prostředků pro osobní péči. Z informací uvedených v literatuře se dá předpokládat, že nemusí docházet k jejich odstranění při procesu čištění, nýbrž jen k částečné sorpci a tudíž se může dostávat do recipientu

a následně do půd, kde se může hromadit a představovat tak do budoucna velký problém pro životní prostředí.<sup>4</sup> PVP se do půdního prostředí může dostávat také při zemědělské činnosti - aplikací hnojiv či pesticidních přípravků, do nichž může být při výrobě přidáván. Z mnohých studií se zdá být PVP biologicky nerozložitelný a i v jeho bezpečnostním listu najdeme, že jeho biologická odbouratelnost je nesnadná.<sup>5</sup> Ve většině případů jsou synteticky vyráběné polymery neschopné přirozeného mikrobiálního rozkladu, v lepším případě jsou tyto polymery rozložitelné, avšak proces má dlouhého trvání. Aby nedocházelo k jejich hromadění v environmentu, je nutné hledat způsoby a možnosti odstraňování těchto látek.<sup>6</sup> Podrobnější charakteristika a využití PVP i možné způsoby jeho degradace převážně ve vodním prostředí byly popsány v několika pracích, na něž tato práce navazuje.<sup>7</sup>

Tato studie se zabývá biologickým rozkladem PVP v půdním prostředí a navazuje tak na sérii diplomových prací prováděných na Ústavu Inženýrství ochrany životního prostředí.

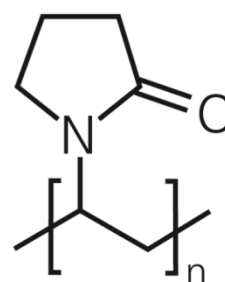
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA PVP

Polyvinylpyrrolidon (PVP), jehož strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 1, byl poprvé syntetizován polymerní reakcí N-vinylpyrrolidonu, pojmenovanou podle svého autora Waltera Reppeho, Reppeho syntéza (1939), který se na jejím výzkumu podílel společně se svými kolegy. Využití PVP nabralo různých směrů, své první uplatnění našel ve 40. letech 20. století jako náhrada krevní plazmy, poté co bylo zjištěno, že nemusí docházet k jeho metabolickému odbourávání v lidském těle, a mohl by se v něm ukládat, bylo od této činnosti ustoupeno.<sup>8,9</sup> Čistý PVP je bílé či bílo-žlutě zbarvený prášek, který je snadno rozpustný ve vodě. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem, z nichž některé jsou uvedeny v tabulce 1, je dnes využívaným polymerem v mnoha aplikacích, může posloužit jako aditivum do různých plastů, používá se při výrobě lepicích pásek či nátěrových hmot. Najdeme ho v oblasti farmaceutického průmyslu, zde slouží jako potahový materiál tablet i v oblasti potravinářství, kde se uplatnil jako stabilizátor<sup>10</sup> či zahušťovadlo (E 1201)<sup>11</sup>. Uplatnil se také v kosmetickém odvětví, a je využíván i ve formě různých směsí jako obalový materiál. Hojně využíván pro funkci obalového materiálu je v zemědělství, slouží pro enkapsulaci pesticidů či hnojiv, jež mají do půdy přicházet s postupným uvolňováním nebo také jako jejich pojivo.<sup>10</sup>

Tabulka 1 Základní informace o PVP<sup>10</sup>

<b>CAS číslo</b>	9003-39-8
<b>obchodní název</b>	Kollidon, Luvitec
<b>M<sub>w</sub>[g·mol<sup>-1</sup>]</b>	10 000-2 200 000
<b>ρ[g·cm<sup>-3</sup>]</b>	1,23-1,29
<b>T<sub>m</sub>[°C]</b>	100-140
<b>T<sub>g</sub> [°C]</b>	175-180
<b>LD<sub>50</sub>[mg·kg<sup>-1</sup>]</b> krysa, orální podání	100 000
<b>LC<sub>50</sub>[mg·l<sup>-1</sup>]</b> <i>Daphnia magna</i> (48 hod)	>100



Obrázek 1 Obecný strukturní vzorec PVP<sup>12</sup>

Existuje mnoho způsobů a cest, jakými se PVP do prostředí dostává, nicméně o jeho dalším osudu v něm není známo mnoho informací a není tedy jasné, zda může docházet k jeho biologickému rozkladu nebo zda zůstává v prostředí nezměněn.

## 2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD

Biodegradace je proces, kdy dochází k rozkladu substrátu vlivem mikroorganismů přítomných v daném prostředí, kde jsou optimální podmínky pro jejich život a dobrou funkci jejich metabolismu. Metabolismus lze popsat jako vysoce organizovaný systém pracující ve dvou základních směrech - anabolismu, kterým jsou nazývány procesy syntézy a je při nich nutné dodávat energii a katabolismu, při kterém dochází k rozkladným procesům a uvolňování energie. Pro správnou funkci metabolismu je potřeba zdroje vody, energie, uhlíku, koenzymů, zdroje fosforu, dusíku, síry, či jiných minerálních látek a také jiných specifických látek, představujících vitamíny či aminokyseliny.<sup>13</sup>

V závislosti na typu mikroorganismu pak biodegradace může probíhat buď za přístupu kyslíku (aerobní) či bez přístupu kyslíku (anaerobní). V aerobních podmínkách dochází k rozkladu substrátu na oxid uhličitý, vodu a dochází také k tvorbě nové biomasy, kdežto v podmínkách anaerobních dochází především ke vzniku methanu, v menší míře pak oxidu uhličitého a dále také vody, minerálních solí a k tvorbě nové biomasy.

Mikroorganismy si žádají pro svou činnost určité podmínky, které zahrnují optimální hodnotu pH, přítomnost živin, intenzitu světla, vhodnou míru koncentrace kyslíku v případě aerobního rozkladu či vlhkosti. Při narušení těchto podmínek může docházet k poklesu mikrobiální činnosti. V průběhu biodegradace také hrají důležitou roli struktura, molekulová hmotnost, stupeň hydrolýzy, aditiva a jiné vlastnosti substrátu a samozřejmě také vliv ostatních fyzikálně-chemických procesů probíhajících v daném prostředí, například fotodegradace či degradace mechanická a tepelná.<sup>14</sup>

### 2.1 Biologický rozklad polymerů

Proces biodegradace polymeru začíná v okamžiku, kdy dochází k jeho ataku mikrobiálními enzymy, které polymer začnou štěpit na oligomerní a monomerní jednotky, jimiž mohou být například hydroxykyseliny. Ty jsou dále využívány jako zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů. Na biomasu je převedena menší část organické sloučeniny – polymeru. Meziprodukty a jiné zbytky se skládají z nedegradovatelné části polymeru.

Biodegradace představuje celý komplex různých mechanismů, které mohou probíhat současně nebo postupně. Mezi tyto mechanismy můžeme zahrnout rozpad, disperzi, rozpouštění, erozi, hydrolýzu a enzymatickou degradaci. Většina z mikrobiálních reakcí, jsou sekvenční, což znamená, že konečný produkt metabolismu jednoho organismu se stává



substrátem pro další organismy. Celý proces biodegradace může trvat dny, měsíce až roky a je pro většinu polymerů rozdílný.<sup>15</sup>

## 2.2 Způsoby testování biologické rozložitelnosti polymerů

Biologický rozklad polymerů je možno pozorovat respektive hodnotit několika způsoby. Tyto způsoby testování můžeme rozdělit do tří základních skupin: testy prováděné v terénu, simulační testy a testy laboratorní. Míru biologického rozkladu pak lze pozorovat metodami uvedenými v následujících podkapitolách pro polymery nerozpustné a rozpustné ve vodě.<sup>16</sup>

### 2.2.1 Polymery nerozpustné ve vodě

Mezi způsoby testování polymerů nerozpustných ve vodě řadíme: vizuální zkoušky, změny termo-mechanických a fyzikálních vlastností, snížení molekulové hmotnosti, chemické změny ve struktuře, tepelnou degradaci (kompostování nebo rozklad za anaerobních podmínek) či hydrolýzu polymeru (vodné prostředí), změnu hmotnosti polymeru a respirometrické testování sledující produkci oxidu uhličitého či spotřebu kyslíku.

#### Vizuální zkoušky

Vizuální zkoušky zahrnují hodnocení makroskopických změn struktury na povrchu biodegradovaného polymeru: zdrsňení povrchu, vytvoření otvorů a trhlin, změnu barvy, tvorbu mikrobiálních kolonií na povrchu, atd. Vizuální změny mohou být použity pro letný odhad biodegradace, respektive zda probíhá či nikoliv. V dnešní době lze použít mnohé mikroskopické techniky, mimo klasickou mikroskopii v procházejícím světle jsou to polarizační mikroskopie, elektronová mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie (SEM) či mikroskopie atomárních sil (AFM, SFM), která slouží k trojrozměrnému zobrazování povrchu. Mezi vizuální zkoušky lze také zařadit počítání vyrostlých mikrobiálních kolonií, které jsou viditelné pouhým okem. Jedná se o jednoduchý, levný a rychlý způsob měření. Jeho výsledky jsou však pouze kvalitativní, neboť nelze pouhým vizuálním hodnocením prokázat, že mikrobiální kolonie nevznikaly s využitím jiné látky obsažené v polymeru, ale s využitím polymeru samotného. Kromě toho mohou být některé strukturální změny polymeru způsobeny degradací chemickou a nikoliv biologickou.<sup>15,16</sup>

#### Změny termo-mechanických a fyzikálních vlastností

Během procesu degradace se používají k měření mechanických změn polymeru testy napětí a deformace (pevnost v tahu, prodloužení při přetržení, modul a mez kluzu). Stejně

standardizované mechanické zkoušky používané pro konvenční polymery lze použít i pro biopolymery. Nevýhodou využití této metody pro sledování biologické rozložitelnosti je, že tyto testy mohou být prováděny pouze v raných fázích procesu biodegradace. Tepelné vlastnosti, jako je teplota skelného přechodu ( $T_g$ ), teplota tání ( $T_m$ ), entalpie, krystalinita se obvykle stanovují pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrické analýzy (TGA). Změnu krystalové struktury lze také pozorovat pomocí rentgenové difrakce.<sup>15,16</sup>

### **Snížení molekulové hmotnosti**

Snížení průměrné molekulové hmotnosti poskytuje první důkazy o probíhající degradaci polymeru. Degradaci polymeru však nelze posuzovat jen z výsledků stanovení úbytku molekulové hmotnosti, i kdyby docházelo k jejím významným rozdílům. Nicméně, tento druh analýzy lze použít k označení místa štěpení v polymerním řetězci při průběhu biodegradace. Molekulová hmotnost biologicky rozložitelného polymeru může být měřena pomocí gelové permeační chromatografie (GPC).<sup>15,16</sup>

### **Chemické změny, tepelná degradace a hydrolýza polymeru**

K detekci chemických změn ve struktuře polymeru se používají metody spektroskopické analýzy, jako je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), UV-VIS spektroskopie, fluorescenční spektroskopie či nukleární magnetická rezonance (NMR), nebo také lze využít hmotnostní spektroskopie (MS).<sup>15,16</sup>

### **Gravimetrické sledování změn hmotnosti polymeru**

Další často používanou metodou pro stanovení biodegradace je měření úbytku hmotnosti polymeru, který je vystaven působení mikroorganismů v kultivačním médiu, kde polymer představuje pro mikroorganismy jediný zdroj uhlíku. S problémy se při této metodě lze setkat, při neopatrném čištění vzorku, nebo v případě, že se materiál nadměrně rozpadá. Měření ztráty hmotnosti vzorků ve skutečnosti není reprezentativním měřením biologické rozložitelnosti, protože úbytek hmotnosti může být způsoben těkáním či rozpouštěním aditiv polymeru, a nebo fyzikálně-chemickými procesy probíhajícími v daném prostředí (hydrolýzou). Kromě toho se metoda týká pouze rané fáze procesu biodegradace a neposkytuje žádné informace o rozsahu mineralizace.<sup>15,16</sup>

Metody SEM, FTIR, TGA, DTG či analýzu úbytku molekulové hmotnosti nebo gravimetrické vyhodnocení byly použity při studiích biologického rozkladu směsných polymerů na bázi PVP Paulou, Royem či Okhitou, jejichž publikace jsou zmíněny v kapitole 3.4.

### Měření produkce oxidu uhličitého či spotřeby kyslíku

Respirometrické metody využívají pro zhodnocení míry biodegradace celkovou produkcí CO<sub>2</sub> při testování v aerobních podmínkách či produkci CH<sub>4</sub> při testování v anaerobních podmínkách. Některé metody jsou založeny na měření spotřeby O<sub>2</sub>. Respirometrická měření můžeme rozdělit na dynamická a statická. Dynamická měření probíhají s kontinuální aerací biomasy. U měření statických dochází jen k provzdušňování difúznímu, což může představovat jistou nevýhodu. Nemusí totiž docházet k plynulému odvádění produktů metabolismu a v důsledku zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> může značně klesnout pH, a tak i mikrobiální činnost.<sup>17</sup>

Existují však i další možnosti sledování procesu biodegradace, jsou jimi např. metody radioaktivního značení, testy ekotoxicity, aj.

#### 2.2.2 Polymery rozpustné ve vodě

Většinu zmíněných metod studia biologické rozložitelnosti v předchozí kapitole bychom nemohli použít pro polymery rozpustné ve vodě, neboť by po aplikaci došlo k jejich rozptýlení v prostředí, pro tyto lze ale také využít testů respirometrických. Mezi metody využívané k měření míry jejich rozkladu patří Sturmův test, Zahn-Wellensův test a Head-Space test.

##### Sturmův test

Sturmův test je znám ve více modifikacích, funguje na principu měření produkce oxidu uhličitého vznikajícího při rozkladném procesu substrátu, jako jediného zdroje uhlíku a lze jej použít i pro ve vodě nerozpustné vzorky. Provádí se v provzdušňovaných reakčních nádobách s biomédiem a inokulem mikrobiální kultury. Vzduch použitý pro aeraci je zbaven oxidu uhličitého a měření je prováděno při 20 °C za kontinuálního promíchávání suspenze v reakčních nádobách. U klasických metod je oxid uhličitý zachycován do roztoku hydroxidu barnatého či hydroxidu sodného a je následně titrován. Nicméně byly také vyvinuty metody automatické, které mohou fungovat na principu zaznamenávání změn elektrické vodivosti standardního roztoku pomocí elektrod umístěných v reakčních baňkách. Automatický přístroj je kalibrován pro vyhodnocení uvolněného oxidu uhličitého. Testování je prováděno zpravidla po dobu 28 dnů.<sup>18,19</sup>

### Head-Space test

Head-Space test je stejně jako předchozí testy prováděn v uzavřených kontinuálně provzdušňovaných nádobách s biomédiem, mikrobiálním inokulem a substrátem v podobě testované látky, která představuje pro mikrobiální kulturu jediný zdroj uhlíku. U této metody je také stanovována produkce oxidu uhličitého vznikajícího při rozkladu substrátu. V průběhu měření jsou injekčně odebírány vzorky plynné fáze. Pro indikaci oxidu uhličitého lze použít plynového chromatografu nebo analyzátoru uhlíku<sup>18,19</sup>.

### Zahn-Wellensův test

Zahn-Wellensův test je metoda určená pro ve vodě rozpustné substráty. Provádět se může v kontinuálně provzdušňovaných děličkách s obsahem biomédia a s vhodnou koncentrací testované látky. Tato směs je následně zaočkována mikrobiální kulturou. V průběhu měření jsou odebírány v pravidelných časových intervalech vzorky. Měřítkem biologického rozkladu je zde stanovení organického uhlíku, které se provádí v dnešní době již výhradně na automatických analyzátorech či stanovením  $CHSK_C$ , vyhodnocením je u těchto testů procentuální úbytek substrátu. Testování se provádí zpravidla po 28 dní.<sup>18,19</sup>

### 2.2.3 Normy pro testování biologické rozložitelnosti polymerů v půdě

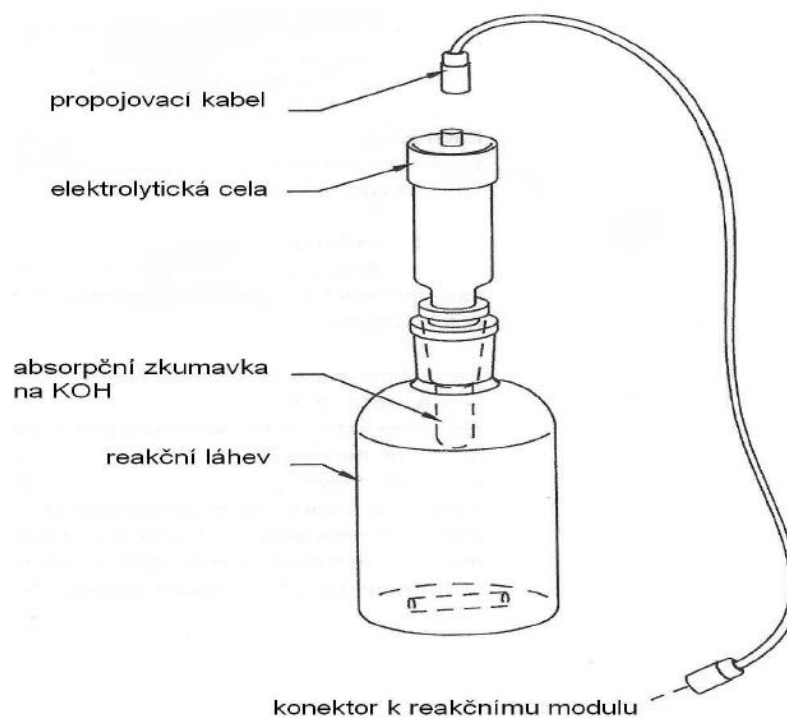
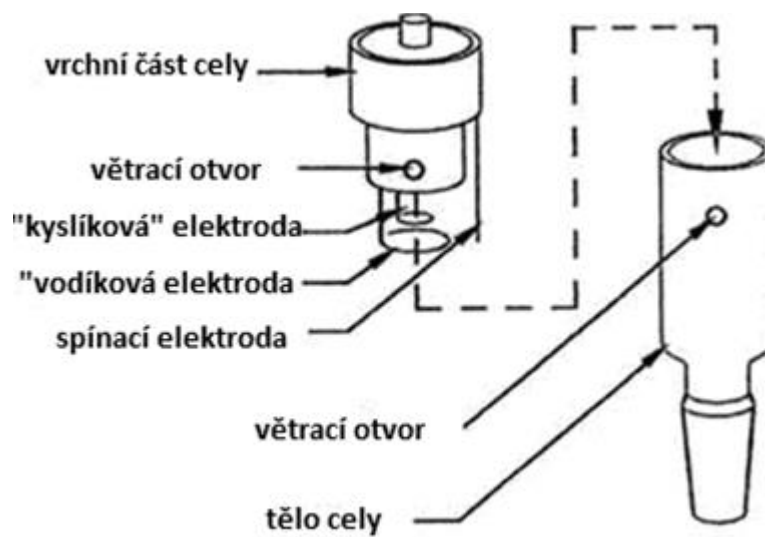
- Mezinárodní norma ISO 11266 *Půdní kvalita – řízení biorozložitelnosti organických látek v laboratorním testu v půdě za aerobních podmínek*, byť nepopisuje žádnou konkrétní metodu, podává nám informace o možnosti postupu výběru vhodné metodiky a jejího provedení za účelem konkrétního stanovení.
- Mezinárodní norma ISO 17556:2003 *Plasty – stanovení konečného aerobního bio-rozkladu v půdě měřením spotřeby kyslíku v respirometru nebo množstvím vyprodukovaného oxidu uhličitého*, již uvádí určitou metodiku, při níž je cílem dosažení optimálního stupně degradace úpravou vlhkosti pozorovaného půdního testu. Dojde-li k adaptaci půdy na sledovanou látku, může být metoda použita pro sledování potenciální biorozložitelnosti, nedojde-li k tomuto adaptačnímu kroku, metoda se stává jen simulací biodegradčních procesů.
- Další takovou metodou je D5988-03 *Standardní zkušební metoda určující aerobní biodegradaci v půdě pro plastické materiály nebo zbytkové plastické materiály po kompostování*.

- Posledními zmíněnými testy jsou tzv. soil burial testy – *Zkouška zahrabáváním do zeminy* ISO 11721-2:2003. Metoda spočívá v zahrabávání vzorků v reálném prostředí environmentu a stanovení biologické rozložitelnosti je prováděno gravimetricky, kdy se měří úbytek hmotnosti vzorku na začátku a konci experimentu, měřeny mohou být i další mechanické, fyzikální či chemické vlastnosti pozorované matrice.<sup>19</sup> Tyto testy byly použity ve studiích zabývajících se biologickým rozkladem PVP El-Mohdyho a Roye, jejichž publikace zmiňuje kapitola 3.4.

Ve své diplomové práci se budu věnovat, na základě vlastností a charakteristiky PVP, metodice měření biologického rozkladu v půdním prostředí v rámci normy ISO 17556:2003 za použití respirometrického přístroje, který měří spotřebu kyslíku a pracuje dle principu popsáno v následující podkapitole.

#### 2.2.4 Respirometr BI 2000

Podrobně funkci respirometru ve své práci popisují Pekařová<sup>20</sup> s Nemečkovou<sup>21</sup>, model sestává ze dvou reakčních modulů po osmi pozicích, kde na každou z nich připadá skleněná láhev o objemu jednoho litru (Obrázek 2). Do této nádoby se umísťuje speciální zkumavka plněná natronovým vápnem, sloužícím pro sorpci vznikajícího oxidu uhličitého při rozkladném procesu v půdě. Na tuto zkumavku se nasazuje elektrolytická cela (Obrázek 3), plněná elektrolytem 0,5 M kyseliny sírové. Každá cela se skládá ze tří elektrod, kyslíkové, vodíkové a tzv. elektrody spínací. Při biologické spotřebě kyslíku a produkci oxidu uhličitého, který je sorbován na natronové vápno, dochází ke vzniku mírného podtlaku, v jehož důsledku dochází k poklesu hladiny elektrolytu a následuje přerušování kontaktu se spínací elektrodou, v tomto okamžiku začne vlivem disociace kyseliny sírové na ionty síranů a vodíku, mezi vodíkovou a kyslíkovou elektrodou procházet elektrický proud. Vodík je vypouštěn do atmosféry, kdežto síranové ionty jsou převáděny kladnou elektrodou na elektroneutrální částice přecházející ve styku s vodou na kyslík. Míra produkce kyslíku se znamená příslušným softwarem.

Obrázek 2 Skladba reakční nádoby k respirometru<sup>21</sup>Obrázek 3 Skladba elektrolytické cely k respirometru<sup>21</sup>

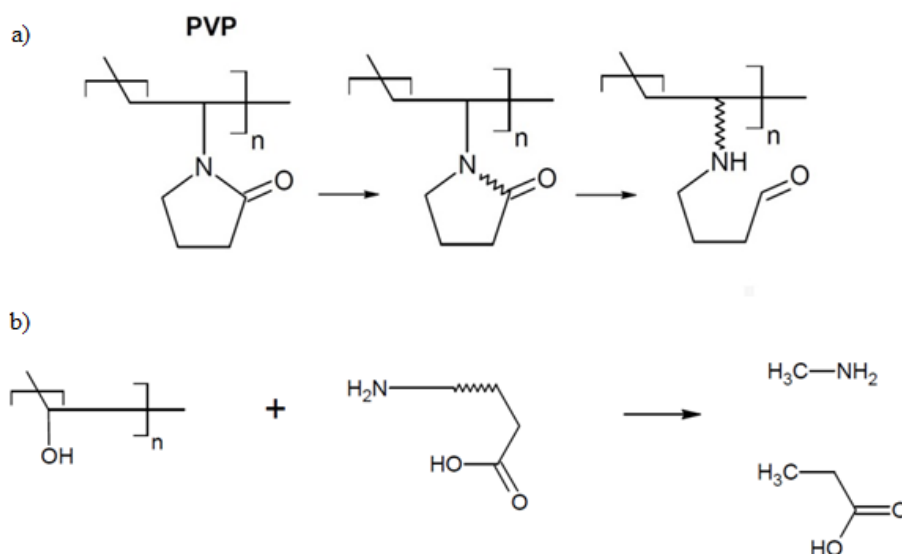


### 3 STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE BIOLOGICKÝM ROZKLADEM PVP

Jelikož biologický rozklad PVP v dnešní době není stále zcela vyjasněn a není o něm známo příliš informací, byla této tématice věnována pozornost v několika diplomových pracích na Ústavu životního prostředí a věnuje se jí i několik zahraničních studií. Tyto práce a studie byly rozčleněny do následujících podkapitol. Zkoumána v nich byla rozložitelnost vzorků PVP o různé molekulové hmotnosti bez jakýchkoliv úprav, ale i vliv jeho různých fyzikálních a chemických úprav, které by měly biologickou degradaci usnadnit. Další možností podpoření rozkladu PVP by mohla být jeho aplikace spolu s jinými rozložitelnými polymery nebo nalezení vhodné mikrobiální kultury se schopností jej rozložit.

#### 3.1 Teoretický biologický rozklad PVP

Mechanismus biologické rozložitelnosti PVP zatím nebyl objasněn. Předpokládá se, že k rozkladu by mohlo docházet postupem uvedeným na obrázku 4, kdy dojde nejprve k rozštěpení laktamového kruhu, a to v místě amidové vazby heterocyklu, nejpravděpodobněji vlivem enzymů gama-laktamáz. Poté by mohlo dojít vlivem aminooxidáz k rozkladu vzniklého sekundárního aminu, přičemž by následoval rozklad vznikajících konečných produktů.<sup>4</sup> Červenáková se ve své práci zamýšlí také nad situací, při níž by mohlo docházet k tvorbě komplexů PVP s vyprodukovanými mikrobiálními enzymy, v důsledku čehož by pak nemuselo vůbec dojít k ataku a rozkladu molekuly PVP.<sup>22</sup>



Obrázek 4 Předpokládaný průběh biologického rozkladu PVP; a) působení gama-laktamáz; b) působení aminooxidáz<sup>4</sup>

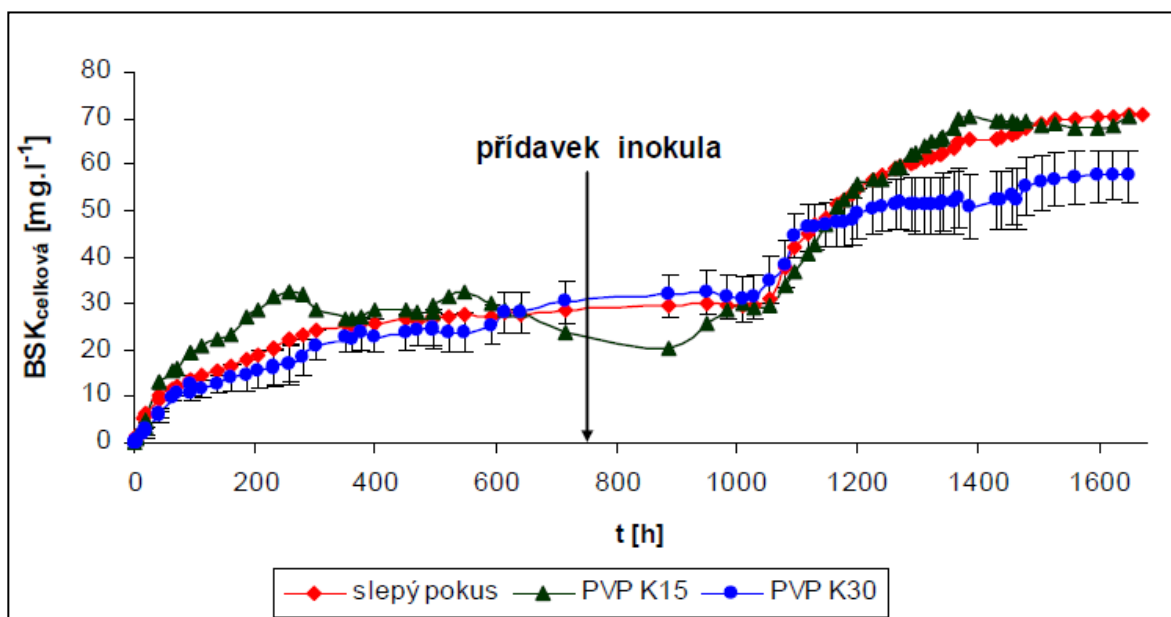
## 3.2 Biologický rozklad neupravených vzorků PVP

Možný biologický rozklad neupravených vzorků PVP byl sledován převážně ve vodném prostředí ovšem s různými typy inokul. Bylo již také provedeno několik málo testů biodegradace PVP v půdním prostředí. V některých diplomových pracích byl sledován i rozklad PVP specifickými mikrobiálními kulturami. V podkapitolách 3.2.1–3.2.4 je uvedeno, jakým způsobem bylo testování biodegradace neupravených vzorků PVP prováděno, a jakých přitom bylo dosaženo výsledků.

### 3.2.1 Vodné prostředí s inokulem z aktivovaného kalu (AK) z městské ČOV; aerobního i anaerobního

O možnosti rozkladu vzorků PVP, bez jejich předešlých úprav, biologickou cestou se ve své diplomové práci zmiňuje Marušincová.<sup>9</sup> Ta prováděla testy biodegradace PVP ve vodném prostředí za přítomnosti aktivovaného kalu z ČOV Malenovice za aerobních podmínek na respirometru BIAL BOD 10, který měří biologickou spotřebu kyslíku i testy za anaerobních podmínek na přístroji Micro-Oxymax. Tento typ respirometru zaznamenává při rozkladném procesu produkci oxidu uhličitého a methanu. Z výsledku práce (Obrázek 5) lze vidět, že po téměř 70 dnech experimentu v aerobních podmínkách nedocházelo vzhledem ke slepému pokusu ke spotřebě  $O_2$  a tudíž lze usoudit, že testované vzorky PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a PVP K30 o molekulové hmotnosti  $40\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  zůstaly nezměněny, čímž by se mohla potvrdit domněnka o biologické resistenci PVP.

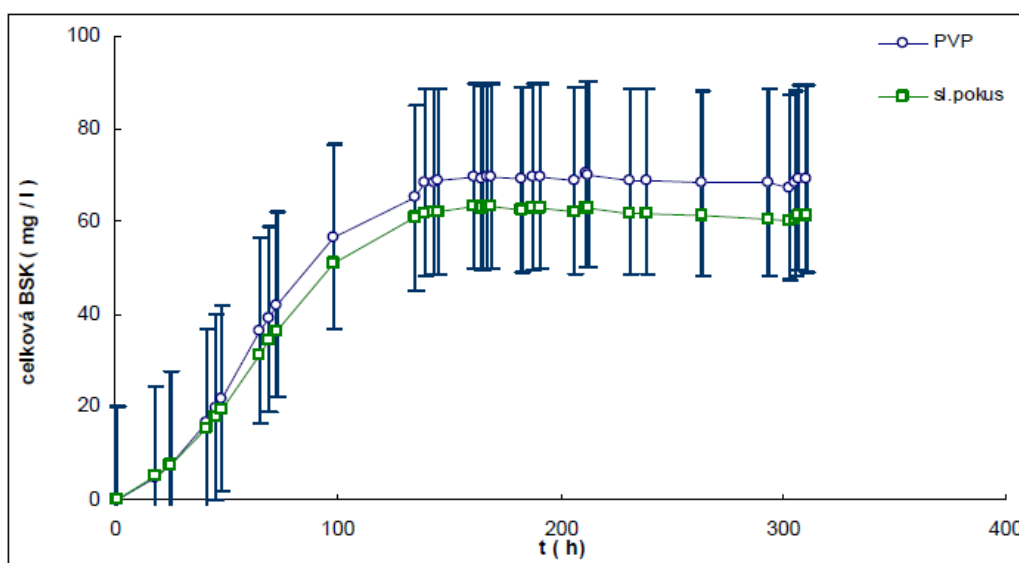
Pro testování rozkladu PVP v anaerobních podmínkách, byl použit vyhnílý kal také z městské ČOV Malenovice. Pro měření byl zředěn minerálním médiem tak, aby byla jeho koncentrace v respiračních baňkách  $3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že rozklad PVP po 24 dnech měření dosahoval 2 % pro oba typy zvolených vzorků. Biologickou nerozložitelnost PVP vůči anaerobním pochodům potvrdila navazující práce Vrlové. Vrlová<sup>23</sup> provedla studii rozkladu neupravených vzorků PVP ve vodném prostředí suspenze vyhnílého aktivovaného kalu z ČOV Malenovice o koncentraci v respiračních baňkách  $2,4\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření bylo prováděno metodou lahvových testů s následnou analýzou plynné fáze pomocí plynové chromatografie (GC/TCD). Úbytek organického uhlíku byl sledován na analyzátoru Shimadzu TOC-5000 A. Testován na biologický rozklad byl opět vzorek PVP K15, stejně jako u předchozích prací. Rozklad PVP po 98 dnech byl kolem 2 %, u dalších testů rozklad nepřekročil 10 %.



Obrázek 5 Průběh BSK u neupravených vzorků v aerobním prostředí kalu z ČOV Malenovice (Marušincová)<sup>9</sup>

### 3.2.2 Vodné prostředí s inokulem z AK z průmyslových ČOV, specifické mikrobiální kultury

Další studií, v níž je zmíněn rozklad neupravených vzorků PVP, je navazující práce Červenákové.<sup>22</sup> Měření rozkladu neupravených vzorků PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  bylo prováděno na respirometru Bial BOD 10. Testy probíhaly v aerobních podmínkách vodného prostředí za přítomnosti inokul z aktivovaného kalu z ČOV Slovenská L'upča, kterou prochází odpadní vody farmaceutické společnosti Biotika a.s. zabývající se výrobou antibiotik. Dalším testovaným inokulem byl aktivovaný kal z ČOV Hlohovec, na níž přichází odpadní vody z výroby léčiv morfolinového typu společnosti Zentiva. Aerobní kaly pro výzkum byly vybírány tak, aby v nich byla velká pravděpodobnost přítomnosti kultury produkující specifické enzymy – laktamázy. Znamky rozkladu neupravených vzorků PVP byly zaznamenány právě v prostředí aktivovaného kalu vznikajícího při čištění odpadních vod z výroby léčiv společnosti Biotika, odebraného v době, kdy v ní probíhala výroba penicilinu. Jak můžeme vidět na obrázku 6, naměřená celková BSK pro rozklad vzorku PVP byla vyšší než u slepého pokusu, byť jsou výsledky zatíženy poměrně velkou chybou, tato skutečnost se stala podnětem pro další zkoumání potenciálních možností biologického rozkladu PVP.



Obrázek 6 Průběh BSK při aerobním rozkladu PVP ve vodném prostředí s inokulem z aktivovaného kalu z průmyslové ČOV AK Sl. L'upča (Červenáková)<sup>22</sup>

Možnosti odstraňování PVP biologickou cestou studovala také Vašková<sup>7</sup>, po zjištění informací získaných od Červenákové, byla práce Vaškové rozšířena o experimenty prováděné i v prostředí zaočkovaném odpadním myceliem z výroby penicilinu obsahujícího specifickou kulturu *Penicillium chrysogenum* se zbytkem živné půdy. Testy byly prováděny bez předešlých úprav polymeru. Pro rozklad byl použit stejně jako v předchozích pracích vzorek PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Respirace byla měřena na přístroji Micro-Oxymax. Z výsledků práce, je patrné, že PVP samotný, ani v této studii, nejevil známky významného rozkladu, téměř ve všech případech se jeho míra pohybovala v rozmezí 4–6 %. Nejúčinnější rozklad však byl v aktivovaném kalu adaptovaném na odpadní vody z výroby penicilinu po jeho zaočkovaní myceliem. Cestou biodegradace je zde považován rozklad laktamového kruhu s předpokladem, že již nedochází ke štěpení polymerního řetězce.<sup>7</sup>

Biologickým rozkladem PVP pomocí bakterií rodu *Sphingomonas* a jejich směsných kultur se zabývá diplomová práce Měrkové<sup>24</sup>. Měření bylo prováděno metodou lahvových testů a metodou zkumavkových degradačních testů s následným vyhodnocením úbytku TOC u odebíraných vzorků v určitých časových intervalech na automatickém analyzátoru TOC Shimadzu. Všechny testy prováděné v lahvách obsahovaly 10 ml minerálního média a  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  pyrrolochinolinchinonu (PQQ), který je využíván jako podpůrný faktor při rozkladech polyvinylalkoholu (PVA). Některé z lahví pak obsahovaly PVP jako jediný zdroj uhlíku, u jiných byl přidáván PVA pro zjištění možnosti případné indukce degradačních

enzymů, které by usnadňovaly rozklad PVP. Měření probíhalo 56 dní, avšak nebyla zaznamenána žádná možnost biologické rozložitelnosti PVP.<sup>24</sup> Biodegradace v prostředí čisté mikrobiální kultury s produkcí gama-laktamáz, *Microbacterium keratanolyticum*, byla pozorována v práci Vyoralové, po 36 dnech testování byl zaznamenán 5% rozklad PVP.

V průběhu let 2009–2012, kdy byly prováděny experimenty s kalem z městské ČOV, která primárně poskytuje aktivovaný kal pro biodegradční testy na Ústav životního prostředí, bylo zjištěno, že je PVP ve vodném prostředí s inokulem tohoto typu rozkládáno průměrně z 5 %. Výsledky testů, které jsou shrnuty v tabulce 2, jsou zatíženy většími či menšími odchylkami, které mohou být způsobeny proměnlivostí kalu v závislosti na ročním období, neboť je známo, že teplota je pro aktivitu mikroorganismů stěžejním fyziologickým faktorem. Dalším faktem, který by mohlo ovlivnit aktivitu mikroorganismů je samotné složení odpadní vody, které je v průběhu roku také značně proměnlivé.

Tabulka 2 Shrnutí dosavadních výsledků prací sledujících biologický rozklad PVP I

		D <sub>PVP</sub> [%]	Doba [dny]	Vyhod.	Literatura	
Aerobní AK	městská ČOV Malenovice	0	70	CO <sub>2</sub>	Marušincová	2009
		3	32	BSK	Vašková	2011
		10	33		Vyoralová	2012
	průmyslová ČOV Sl. L'upča	4	9		Vašková	2011
Mikrobiální kultura	AK + mycelium	8,5–25	32		Vašková	2011
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	25	33	Vyoralová	2012	
	<i>PI + Microbacterium keratanolyticum</i>	5	36	Vyoralová	2012	
Anaerobní AK	Městská ČOV Malenovice	2,5	24	CO <sub>2</sub>	Marušincová	2009
		2–10	98	+ CH <sub>4</sub>	Vrlová	2011

### 3.2.3 Vodné prostředí s různými typy inokul půdy a půdy samotné

V práci Vaškové byly prováděny experimenty zabývající se rozkladem PVP ve vodném prostředí s půdními inokuly či v prostředí půdním, které se zdají být pro biodegradaci PVP vhodnější. Docházelo v nich k rozkladu lehce nad 5 % po 39 denním testu v prostředí lesní půdy a 29 denním testu v prostředí jejího inokula. Adsorpce PVP na pevné půdní složky zde byla vyloučena.<sup>7</sup>

Předpoklady mikrobiálního rozkladu PVP se poté zabývala Vyoralová<sup>25</sup>, ta studovala rozklad PVP a jeho strukturních analogů v prostředí zahradního kompostu, komerčního kompostu a zemědělské půdy. Z kompostů a půdy byla také připravena inokula a rozklad byl pozorován i v jejich vodných roztocích. Měření bylo prováděno na respirometru Micro-Oxymax. Úbytek PVP (organického uhlíku) byl sledován stanovením na analyzátoru Shimadzu TOC-5000 A. Pozitivní rozklad PVP byl zaznamenán v případě testů probíhajících v prostředí inokula zemědělské půdy, kdy docházelo k rozkladu z 30 % za 36 dní. Směsná půda připravená ze zemědělské půdy a komerčního kompostu v poměru (1:5) vykazovala po 33 dnech rozklad PVP 16 %.

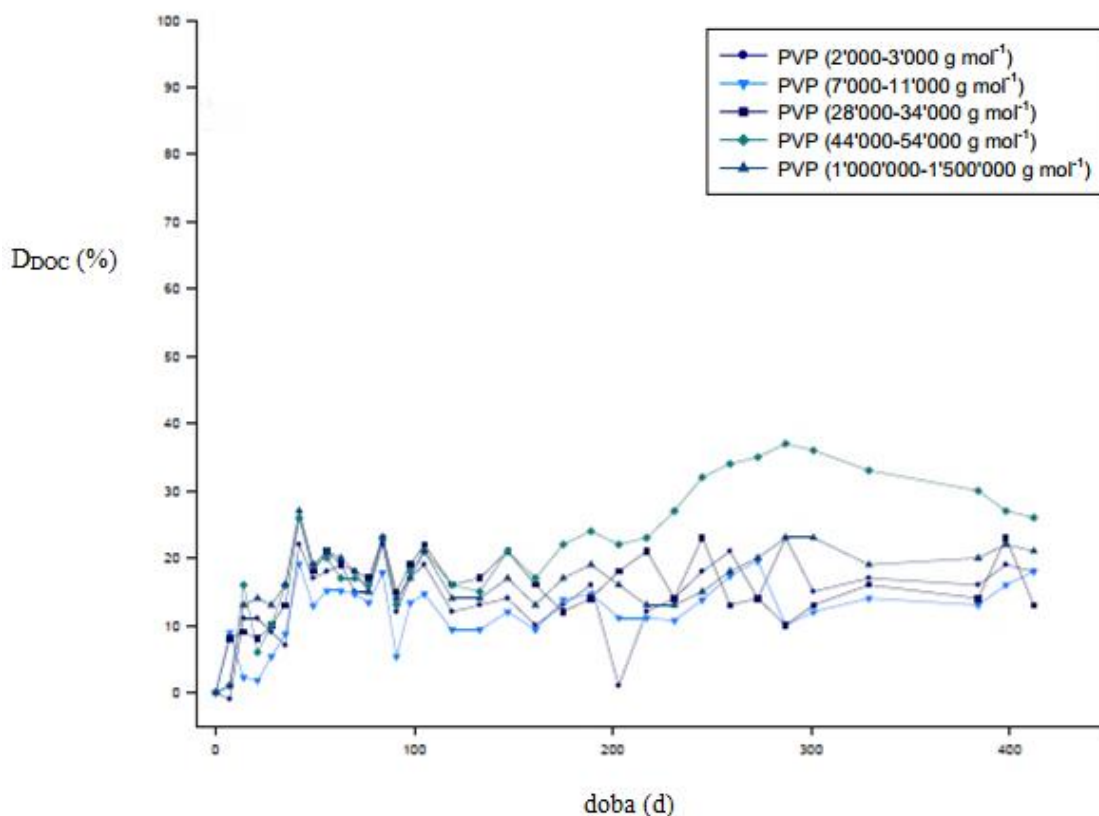
Tabulka 3 Shrnutí dosavadních výsledků prací sledujících biologický rozklad PVP II

	<b>D<sub>PVP</sub>[%]</b>	<b>Doba [dny]</b>	<b>Vyhod.</b>	<b>Literatura</b>	
Zahradnický kompost	3	33	BSK	Vyoralová	2012
Směsná půda	16	33		Vyoralová	2012
Lesní půda	6,5	39		Vašková	2011
Půdní inokulum zahradnického kompostu	4	36		Vyoralová	2012
Půdní inokulum zemědělské půdy	30	36		Vyoralová	2011
Půdní inokulum lesní půdy	7	29		Vašková	2011
Půdní inokulum komerčního kompostu	2	36		Vyoralová	2012



### 3.2.4 Biologický rozklad v prostředí mořské vody

Eubeler<sup>26</sup> ve své disertační práci popisuje studium biologického rozkladu neupraveného PVP o různých molekulových hmotnostech v prostředí média připraveného z mořské vody. Průběh jeho měření je znázorněn na obrázku 7. Pozorovaný mírný nárůst  $D_{DOC}$  je připisován možné sorpci PVP na skleněné stěny nádob používaných při experimentu či sorpci na biomasu. V průběhu měření totiž nebyla detekována žádná produkce oxidu uhličitého vznikajícího při biodegradaci, která by mohla potvrdit biologický rozklad PVP.



Obrázek 7 Biodegradace PVP v prostředí mořské vody (Eubeler)<sup>26</sup>

Dosavadní studie zabývající se rozkladem samotných neupravených vzorků PVP zatím nedošly k závěrům, které by mohly potvrdit jeho rozložitelnost, nicméně z naměřených výsledků nemůžeme hovořit ani o jeho jasné rezistenci. V řadě prací bylo tedy přistoupeno na možnost podpoření jeho rozkladu za použití kosubstrátů.

### 3.3 Vliv kosubstrátů na biologický rozklad PVP

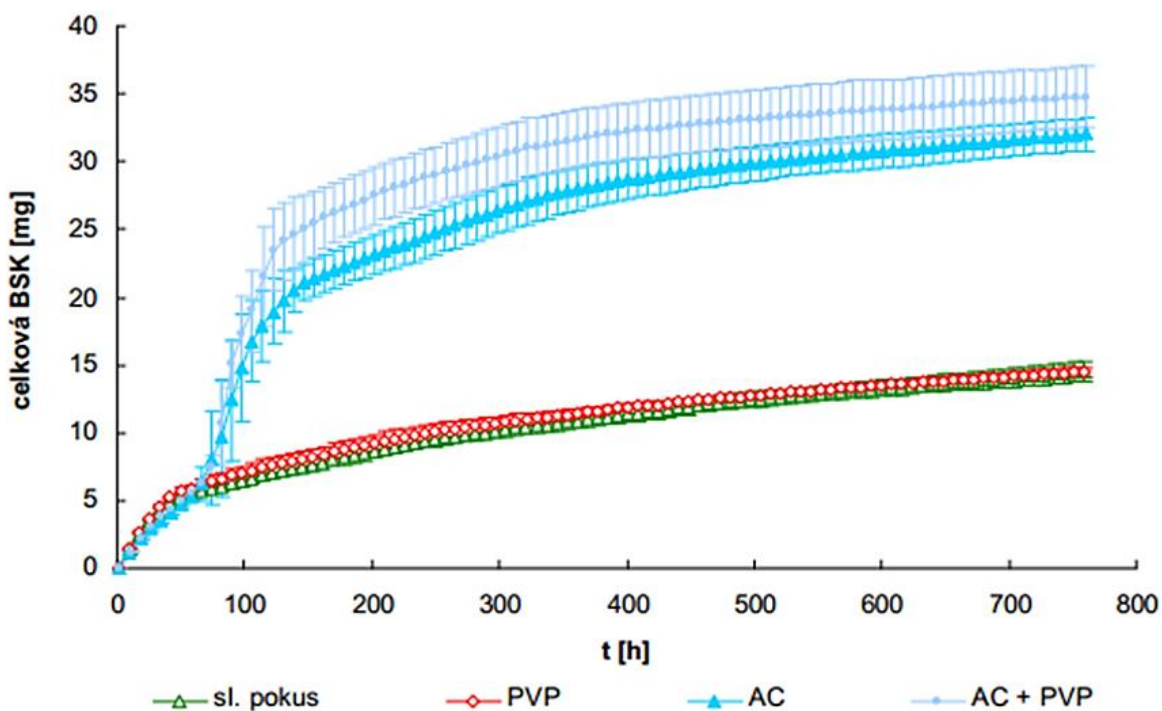
Tématice kosubstrátů je věnována pozornost v remediačních technologiích, kdy je mnohdy účinnější odstraňování látky v systému kosubstrát – polutant. Jedná se o proces, kdy dochází k rozkladu kontaminantu široce působícími enzymy za přítomnosti substrátů.<sup>27</sup> Při pozorování vlivu enzymatického vybavení vznikajícího při rozkladu kosubstrátu na rozklad PVP byly použity dva způsoby testování a to buď adaptace prostředí na kosubstrát či rozklad PVP přímo ve směsi s kosubstrátem v poměru 1:1.

#### Rozklad PVP a v prostředí adaptovaném na kosubstrát

Rozkladem PVP v prostředí adaptovaném na kosubstrát, jímž byl zvolen strukturální analog PVP, 1-methyl-2-pyrrolidon (NMP), se zabývala již zmíněná práce Červenákové<sup>22</sup>, kde bylo zjištěno, že tato látka samostatně velmi dobře podléhá biologickému rozkladu, avšak významný vliv na rozklad PVP enzymatickým vybavením mikroorganismů podílejících se na rozkladu NMP nebyl zaznamenán. Rozklad PVP se po 15 dnech měření pohyboval mezi 6–15 %.

#### Rozklad PVP ve směsi s kosubstrátem (1:1) bez předchozí adaptace prostředí

Dalšími pracemi využívající strukturální analogy PVP jsou práce Vaškové<sup>7</sup>, Vrlové<sup>23</sup> či Vyoralové<sup>25</sup>. V práci Vaškové<sup>7</sup> je zkoumán vliv těchto kosubstrátů přímo ve směsi se vzorkem v poměru PVP:kosubstrát (1:1). Studován nebyl pouze vliv strukturálních analogů, ale také látek, které by mohly po vlastním rozkladu indukovat produkci enzymů gama-laktamáz. Byl zjištěn možný vliv enzymů bakterií rozkládajících akrylamid (AC), (Obrázek 8), který by mohl podpořit rozklad PVP. V práci jsou také zmínky o rozkladu PVP spolu s NMP či N-acetyl-L-fenylalaninem (APhA), tyto látky ale nevykazují žádný významný vliv na biologický rozklad PVP, byť jsou samy poměrně dobře rozložitelné. Dalším využitým kosubstrátem byl v práci Vrlové<sup>23</sup> 1-oktyl-2-pyrrolidon (OP), spolu s dříve testovaným NMP, ani v této práci látky nejevily žádný významný vliv na biorozložitelnost PVP. OP navíc sám není snadno biologicky odbouratelný. Se stejnými kosubstráty pracovala také Vyoralová<sup>25</sup> v půdě a půdních inkulech, u ní byl pozorován vliv N-acetyl-L-fenylalaninu, v jehož přítomnosti byl PVP rozložen po 46 dnech téměř z 50 %, ovšem tento výsledek je zatížen velkou chybou. Shrnutí použitých kosubstrátů a jejich dosavadní pozorovaný vliv na rozklad PVP v diplomových pracích jsou uvedeny v tabulce 4.

Obrázek 8 Vliv akrylamidu na rozklad PVP (Vašková)<sup>7</sup>

Tabulka 4 Shrnutí výsledků prací zabývajících se vlivem vybraných kosubstrátů na biologický rozklad PVP

	Prostředí	D <sub>PVP</sub> [%]	Doba [dny]	Vyhod.	Literatura	
NMP/PVP	aer, AK	6–15	15	BSK	Červenáková	2010
	aer, AK	15	32		Vašková	2011
	anaer, AK	20	25	CO <sub>2</sub> +CH <sub>4</sub>	Vrlová	2011
OP/PVP	zem. kompost	2–8	46	BSK	Vyoralová	2012
AC/PVP	aer, AK	21	32		Vašková	2011
APhA/PVP	aer, AK	8	32		Vašková	2011
	zem. kompost	10–49	46		Vyoralová	2012

Pozn.: *aer* – aerobní prostředí; *anaer* – anaerobní prostředí; *AK* – vodné prostředí s inokulem z AK ČOV Malenovice, *zem. kompost* – půdní prostředí zemědělského kompostu.

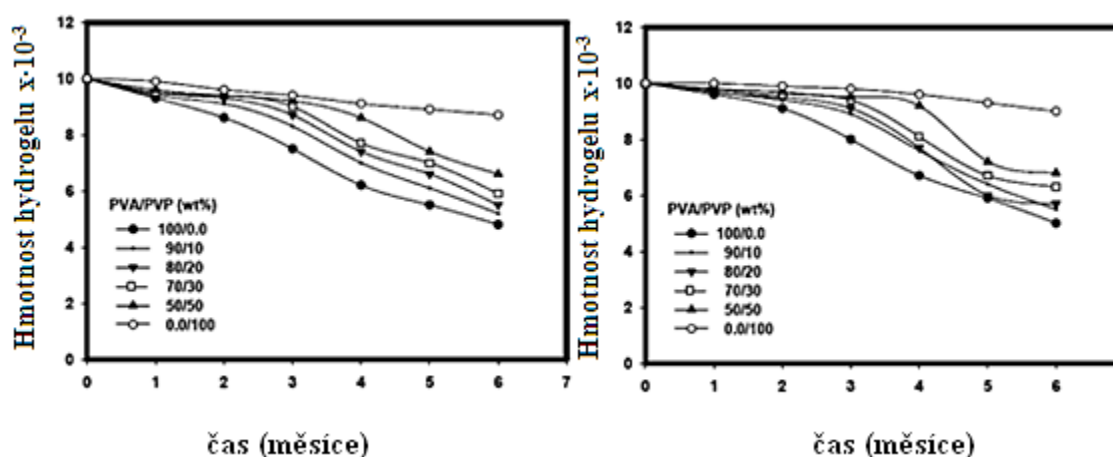
### 3.4 Biologický rozklad předupravených vzorků PVP

Po zkušenostech uváděných v dostupné literatuře zabývající se předúpravou vzorků PVP, kam patří například práce Hirokoshiho<sup>28</sup>, Loraina<sup>29</sup> či Girota<sup>30</sup>, byla v práci Marušincové<sup>9</sup> věnována pozornost studiu možností předúpravy vzorků metodami úprav pomocí Fentonových reakcí, fotooxidační degradaci a oxidační degradaci. Oxidační degradace ovšem nebyla shledána příliš efektivní. Upravené vzorky podrobené Fentovým reakcím či fotooxidační degradaci byly ponechány biologickému rozkladu a zde již byla patrná účinnost předchozích kroků. Výsledkem bylo po 472 hodinách experimentu dosažení 50 % biologického rozkladu vzorků PVP v aerobním prostředí a v anaerobním prostředí účinnost rozkladu PVP nepřesáhla 45 %.

Dalšími předúpravami vzorků PVP ve snaze o zjištění nové možnosti jeho odstranění se zabývala v diplomové práci Červenáková<sup>22</sup>, ta studovala rozklad vzorků PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  po jeho bazické hydrolyze, jejíž vliv na strukturu pozorovala pomocí IČ spektroskopie. Experiment byl zaměřen na rozklad PVP v různých typech kalů z čistíren odpadních vod. Vzorky upravené bazickou hydrolyzou byly podrobeny testu biorozložitelnosti na přístroji Micro-Oxymax, také v aerobních podmínkách vodného prostředí. Úprava vzorků bazickou hydrolyzou i přes výrazné změny ve struktuře PVP, se ukázala být pro podporu jeho rozkladu jen málo efektivní, docházelo k biodegradaci PVP pouze kolem 10 %. Biologický rozklad byl také pozorován v rámci Zahn-Wellens testu měřícího úbytek TOC vzorku po dobu 28 dní, leč ani on nepotvrdil možnou rozložitelnost PVP.

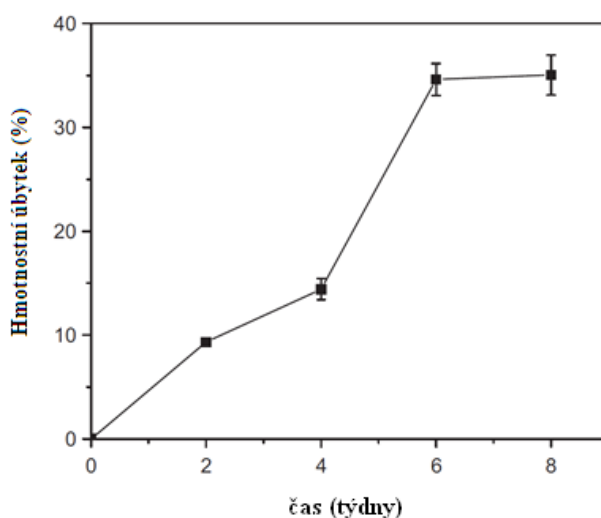
### 3.5 Biologický rozklad PVP ve směsích

Jednou z mála publikovaných prací na toto téma je studium rozkladu směšného hydrogelu PVA/PVP připraveného v různých poměrech a upraveného gama-zářením autorů Ghanema a Abd El-Mohdyho. Tato studie jako první potvrdila reálnou možnost biologického rozkladu PVP v půdním prostředí. Měření bylo prováděno pomocí gravimetrické metody „soil burial“ testů v písčité a jílové půdě. Oba testy dosáhly pozitivních výsledků u hydrogelů ze samotného PVP a to v míře u jílové půdy 13 % za 6 měsíců a za stejnou dobu došlo k 10% rozkladu v půdě písčité. Průběhy testů za 6 měsíců pro jednotlivé poměry PVA/PVP v daných půdách jsou znázorněny na obrázku 9. Z výsledků studie lze předpokládat, že významný podíl na rozkladu měla právě předúprava vzorků gama-zářením, kdy mohlo dojít ke strukturálním změnám polymeru.<sup>31</sup>



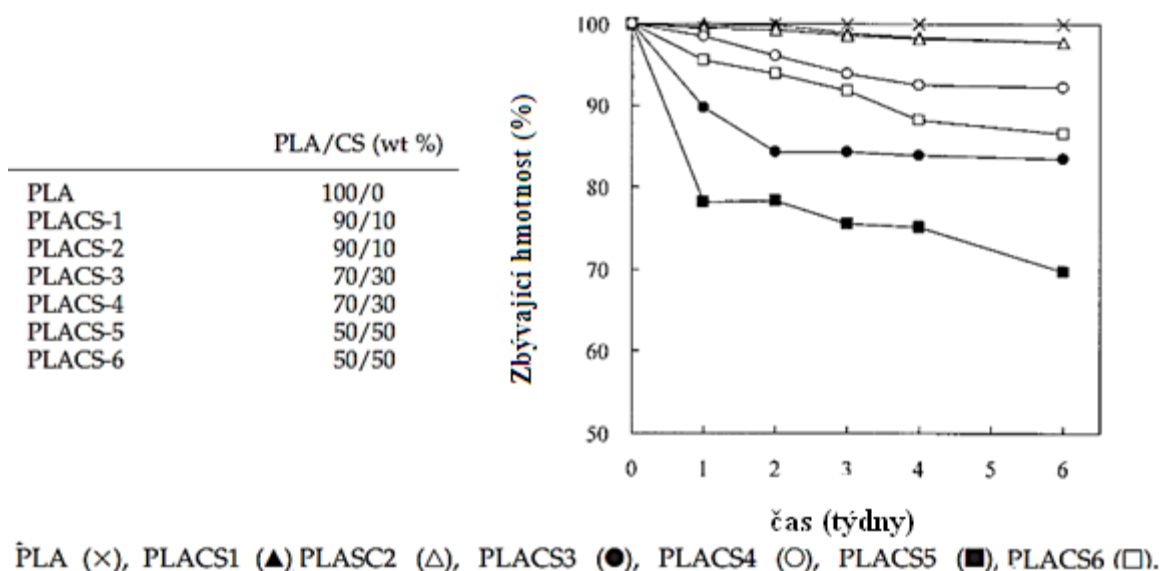
Obrázek 9 Rozklad PVP v písčité půdě (vlevo) a v jílové půdě (vpravo) (Ghanem)<sup>31</sup>

Další publikovanou prací, která se věnuje rozkladu PVP ve směsích je studie biologického rozkladu směsného polymeru PVP a karboxymethylcelulózy (PVP/CMC), kterou prováděl Roy<sup>32</sup>. Studované hydrogely byly připravovány z vodného roztoku PVP K30 o molekulové hmotnosti  $40\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti  $3015 - 3685\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , CMC, agaru a glycerinu o různých poměrech. Optimálním poměrem se zdál být poměr PVP/CMC 20:80. Testování biorozložitelnosti bylo prováděno v prostředí zahradnického kompostu a vyhodnoceno bylo po 8 týdnech gravimetricky. Průběh testu je znázorněn na obrázku 10. Z výsledků měření poukazujících na 35% rozklad směsného polymeru, lze předpokládat, že docházelo pouze k rozkladu CMC.<sup>32</sup>



Obrázek 10 Biodegradace PVP/CMC (20:80) (Roy)<sup>32</sup>

Dalším polymerem využívaným pro výrobu polymerních směsí PVP je kyselina polymléčná (PLA). Samotná PLA byla poprvé syntetizována v roce 1932 Cartothersem, jedná se o lineární alifatický polymer tvořený z kyseliny mléčné. Patří do skupiny termoplastů a je ve vodě nerozpustným polymerem.<sup>33</sup> Biodegradace PLA byla poprvé popsána v roce 1981 Williamsem, který se zabýval její enzymatickou hydrolýzou. Od té doby bylo publikováno mnoho studií o možné rozložitelnosti PLA a je tak považována za biodegradovatelnou. Rozkládána je mnohými druhy mikroorganismů a v poslední době se o ní hovoří v souvislosti s kompostováním a jejím využitím pro výrobu láhví.<sup>34</sup> PLA se využívá také na výrobu tkanin, vláken, fólií, desek, nákupních tašek, syntetického papíru či pytlů na odpadky nebo také na obálky s průhledným okénkem.<sup>10</sup> Biologický rozklad PLA však závisí na podmínkách měření, je známo, že při pohřbívacích půdních testech je velmi pomalý.<sup>35,36,37</sup> Nízká degradace filmů PLA může být způsobena nízkým obsahem vody v půdě a také nepřítomností mikroorganismů, které by byly schopny jejího rozkladu. Okhita<sup>38</sup> se ve své práci zabýval rozkladem směsného polymeru PLA se škrobem v půdě, a také rozkladem samotné PLA (Obrázek 11), z výsledků jeho pozorování je zřejmé, že v půdních testech k jejímu biologickému rozkladu nedocházelo.

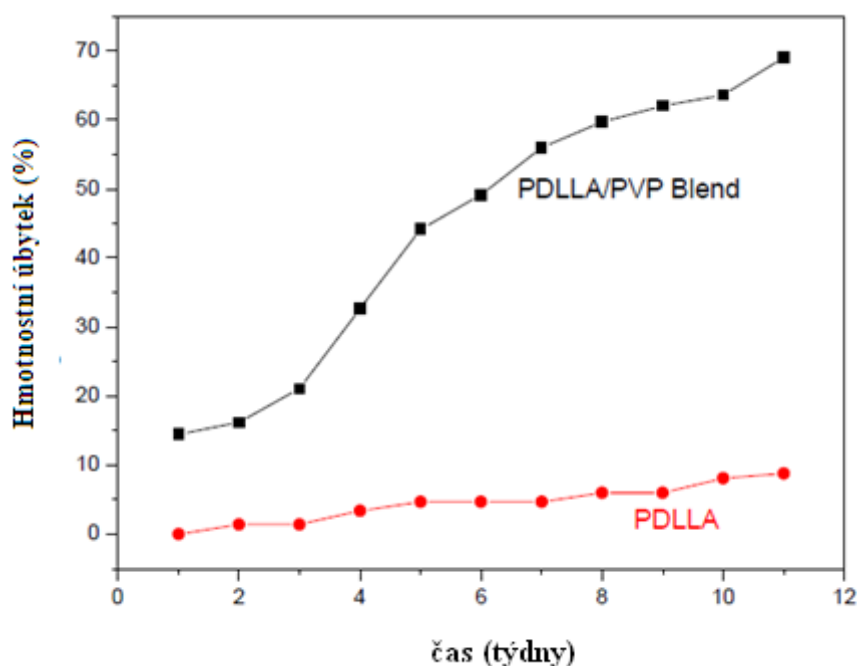


Obrázek 11 Biodegradace PLA, PLA/škrob (Okhita)<sup>38</sup>

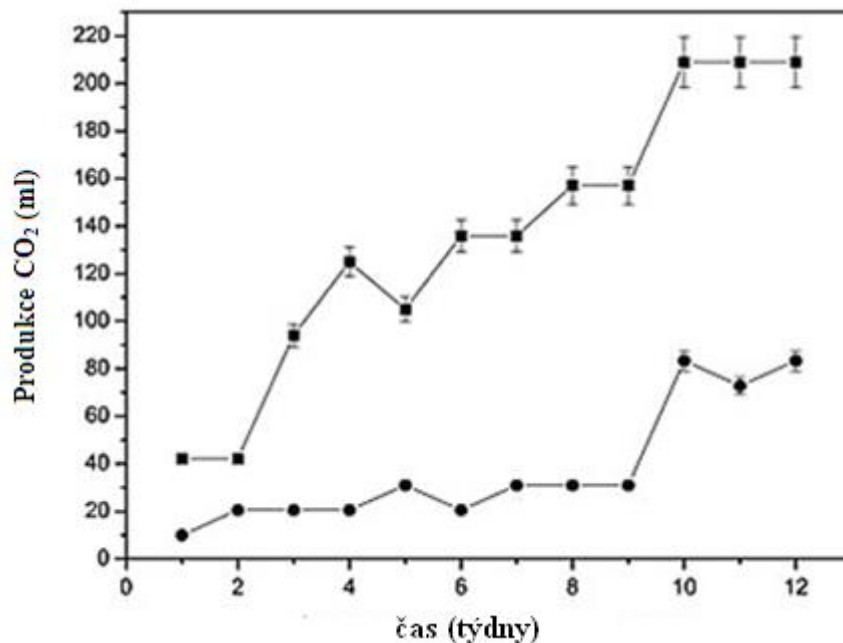
Zajímavé výsledky ohledně směsného polymeru PVP/PLA publikoval Paula<sup>39</sup> a kolektiv, jejich studium biologického rozkladu této směsi pomocí Sturmova testu zaznamenalo velmi pozitivní výsledky. Biodegradační test byl prováděn v prostředí inokula připraveného z 600 g humusu a 60 ml vody o výsledném pH 8,2 a sušíně 21 %. Testovány byly vzorky připravené smícháním samostatně rozpuštěných látek PVP a PLA



v chloroformu v různých poměrech. Při měření bylo zjištěno, že po 11 týdnech experimentu dochází k hmotnostnímu úbytku připraveného vzorku až o 70 % (Obrázek 12). Pravděpodobně zde, díky snadné rozpustnosti PVP, dochází k vymytí jeho podílu z fólie do vodného prostředí. Nicméně z obrázku 13, který znázorňuje průběh produkce oxidu uhličitého je zřejmé, že k rozkladu zde opravdu docházelo, ovšem není jasné, zda docházelo k rozkladu PVP či PLA. Z měření je také patrné, že samotná kyselina polymléčná biologickému rozkladu spíše nepodléhá. Získané výsledky je nutno ještě experimentálně prověřit, neboť studií týkajících se této problematiky nebylo provedeno dostatečné množství, které by umožnilo tvořit závazné závěry.



Obrázek 12 Rozklad směsi PVP/PDLLA (50:50) (Paula)<sup>39</sup>



Obrázek 13 Produkce CO<sub>2</sub> při rozkladu PVP/PLA fólie (50/50) (Paula)<sup>39</sup>

Publikovány byly i další studie zabývající se přípravou směsných polymerů s obsahem PVP. Jako příklad lze uvést studii zabývající se tvorbou polymerních směsí polyvinylpyrrolidonu s polyvinylalkoholem (PVP/PVA) a PVP se škrobem (PVP/St), kterou se zabýval El-Houssiny<sup>40</sup>. Směsné fólie PVP/PVA studoval ve své diplomové práci i Lahuta<sup>41</sup>, který tak navázal na svou bakalářskou práci, zabývající se přípravou fólií z PVP<sup>42</sup>. Směsné polymery PVP jsou v dnešní době studovány v souvislosti s tkáňovým inženýrstvím<sup>43</sup>, které představuje vlastní vědní obor, a které na tyto směsi klade nároky především ze strany biokompatibility, jejich mechanických vlastností a možnosti rozkladu. Jako další příklady těchto směsných polymerů lze pro zajímavost uvést směsi PVP s kaprolaktonem (PVP/PCL)<sup>44,45</sup>, PVP s chitosanem síťovaným pomocí genipinu<sup>46</sup>, PVP s polyethylenglykolem (PEG/PVP)<sup>47</sup> či PVP s polydimethylsiloxanem (PDMS/PVP)<sup>48</sup>, aj.

## 4 SHRUTÍ LITERÁRNÍ REŠERŠE A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Shrnutím informací získaných z literární rešerše nelze konstatovat, zda PVP samotný je biologicky odbouratelný, či nikoliv. Většina diplomových prací sice poukazuje na rezistenci PVP vůči mikrobiálnímu působení, nicméně v práci Vaškové a Vyoralové k rozkladu PVP zřejmě mohlo docházet. Jelikož bylo dosaženo vyššího procenta rozkladu PVP v půdě a půdních inokulech, bude tato práce zaměřena na studium rozkladu PVP v půdním prostředí. Co se týče již testovaných možností předúprav vzorků PVP, které by měly jeho odstranění usnadnit, prozatím nejúčinnější metodou je jeho vystavení Foto-Fentonovým reakcím. Možnost odstranění PVP představuje také jeho rozklad spolu s kosubstráty, jimiž jsou voleny v případě PVP jeho strukturní analogy (NMP, OP) či látky, jež by mohly vyvolat produkci gama-laktamázy (AC, APhA), která má schopnost štěpit laktamový kruh. V průběhu diplomových prací z let 2010–2013 bylo zjištěno, že pozitivní vliv na rozklad PVP by mohl mít akrylamid. Cílem diplomové práce bude tedy ověřit dosažené výsledky a pozorovat biologický rozklad PVP v půdním prostředí adaptovaném na výše zmíněné kosubstráty.

Dalším rozsáhlým a aktuálním tématem v dnešní době je příprava směsných polymerů. PVP je v tomto směru hojně využíván a v některých studiích je dokonce považován za dobře rozložitelný. Avšak samotné testování těchto polymerů na biodegradaci doprovází jen několik málo z těchto studií, nicméně z výsledků je zřejmé, že když už je směsný polymer biologicky rozkládán, jedná se zpravidla o rozklad jiného polymeru ve směsi. V případě studie de Pauly je sledován biologický rozklad polymerní směsi PVP a PLA. PVP i PLA jsou obtížně rozložitelné. Nicméně de Paula zde hovoří o pozitivním rozkladu. Výsledky této publikace budou v rámci diplomové práce také ověřeny, bude připravena sada fólií z této polymerní směsi vyrobených dle postupu uvedeným de Paulou<sup>39</sup>. Jejich rozklad bude pozorován v půdním prostředí a ve vodném prostředí s inokulem z AK z ČOV Malenovice.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V následující části diplomové práce je v podkapitolách 5.1–5.6 uvedeno, jaké bylo při práci využíváno přístrojové vybavení a chemikálie. Dále je zde charakterizován použitý biologický materiál, tedy typ půdy a aktivovaného kalu, v nichž byl pozorován biologický rozklad vzorků. Mimo samotný PVP byl sledován biologický rozklad směsného polymeru, jehož vzorky představovaly námi připravené fólie PVP/PLA a fólie PVP/PLA/kosubstrát, které byly vyráběny za účelem možnosti podpoření rozkladu PVP. Byly provedeny testy na nasákavost a rozpustnost těchto fólií, pořízeny snímky na SEM či naměřena jejich spektra pomocí FTIR. Kapitola popisuje postup přípravy experimentů a ostatních stanovení. Jsou zde také uvedeny matematické vztahy, podle nichž byl rozklad vyhodnocován.

### 5.1 Přístrojové vybavení

V diplomové práci bylo využito následující přístrojové vybavení:

Mikrorespirometr Micro-Oxymax, Columbus Ins., Ohio, USA,

Analyzátor organického uhlíku Schimadzu TOC-5000 A, Shimadzu Corp. Japonsko,

pH metr pH/mV/ION metr 735, Ion Lab WTW, Německo,

Respirometr BI-2000, Bioscience Corp., USA ,

Analytické váhy Sartorius, Německo,

Centrifuga Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Německo,

FTIR-ATR Nicolet iS10, Thermo Scientific, USA,

Elektronový mikroskop Vega II/LMU, Tescan, Česká republika,

Spektrofotometr DR/2010, Hach Company, USA,

Termoreaktor RD 125, Lovibond, Německo,

Mikrováhy Mettler MX-5, Toledo International Inc., USA,

Analyzátor Flash EA 1112 CHNS/O, Thermo Electron Corp., USA,

běžné laboratorní sklo a vybavení.

## 5.2 Použité chemikálie a roztoky

Byly použity následující chemikálie čistoty p.a. od firem Lachema, a.s. a Penta.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu železitého
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	síran amonný
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	dihydrogenfosforečnan draselný
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu draselného
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu hořečnatého
$\text{CaCl}_2$	chlorid vápenatý
$\text{H}_3\text{BO}_3$	kyselina boritá
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinečnatého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu manganatého
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu měďnatého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdenanu amonného
KCl	chlorid draselný
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	hexahydrát dusičnanu hořečnatého
$\text{H}_2\text{SO}_4$	kyselina sírová
$\text{CHCl}_3$	chloroform

Použitými vzorky byly následující látky čistoty p.a. od firmy Sigma-Aldrich s.r.o.

$\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$	polyvinylpyrrolidon (PVP K15)
$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$	1-methyl-2-pyrrolidon
$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}$	1-oktyl-2-pyrrolidon
$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	akrylamid
$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	N-acetyl-L-fenylalanin
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	glukóza

Jako absorpční látka do zkumavek respirometru BI 2000 byla použita Soda Lime ( $\text{NaOH}/\text{CaO}$ ) s indikátorem také od firmy Sigma-Aldrich s.r.o.

Z uvedených chemikálií byly připraveny následující roztoky.

### Příprava elektrolytu pro respirometr BI 2000

Cely respirometru byly plněny elektrolytem 0,5 M kyseliny sírové, který byl připraven následovně. Do odměrné baňky o objemu 1 l naplněné 800 ml destilované vody, bylo za současného chlazení pipetováno 28 ml 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , poté byl objem baňky doplněn po rysku. Elektrolyt byl v průběhu měření dle potřeby doplňován do měřících cel.

### Příprava biomédia

Biomédium bylo připravováno do 1 l odměrné baňky, nejprve bylo do láhve nadávkováno přibližně 800 ml destilované vody a následně byly pomocí automatických dávkovačů za průběžného míchání přidávány následující roztoky daného složení:

- 20 ml fosfátového pufru ( $8,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1,75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$  a  $44,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ),
- 5 ml roztoku síranu amonného ( $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ),
- 1 ml roztoku chloridu vápenatého ( $27,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{CaCl}_2$ ),
- 1 ml roztoku chloridu železitého ( $0,25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{FeCl}_3\cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ),
- 1 ml roztoku síranu hořečnatého ( $22,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{MgSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ),
- 1 ml roztoku stopových prvků ( $0,75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,18 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{CoSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{MnSO}_4\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{CuSO}_4\cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ZnSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{FeSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ),

následně byl obsah baňky doplněn po rysku.

### Příprava nasyceného roztoku soli do exsikátoru s vlhkostí cca 53 %

Nasycený roztok  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  byl připraven rozpuštěním 260 g soli ve 100 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

### Příprava roztoku 0,2 M KCl pro stanovení $\text{pH}_{\text{KCl}}$

Navážka 1,4910 g KCl byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, po rozpuštění KCl byl obsah baňky doplněn po rysku.

### 5.3 Použitý biologický materiál

Biologický rozklad PVP byl v rámci diplomové práce pozorován v půdním prostředí, které bylo simulováno v laboratoři připravenou směsnou půdou, a také ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu z ČOV Malenovice.

#### Půda

Zemědělská půda jílového typu, byla odebrána v oblasti Zlín–Štákovy paseky. Pro diplomovou práci byly provedeny celkem dva odběry půdy, první odběr byl realizován v dubnu roku 2014 („jarní“ odběr), druhý odběr na podzim roku 2014 („podzimní“ odběr). První odběr půdy měl relativní vlhkost 8 %, skladován byl v uzavřené nádobě při laboratorní teplotě. Vzhledem k meteorologickým podmínkám, které nastaly v době druhého odběru, měla půda z podzimního odběru vysokou vlhkost, a proto bylo přistoupeno k jejímu vysušení za laboratorní teploty až do relativní vlhkosti 7 %. Vysušená půda byla uskladněna opět v uzavřené nádobě při laboratorní teplotě. Organický podíl této jílové půdy byl stanoven jako 6,94 %, zbylý anorganický podíl tvořil 93,06 %. Při elementární analýze bylo stanoveno následující zastoupení prvků: C –  $2,25 \pm 0,08$  %, H – 0,45 %.

#### Komerční zahradnický kompost

Pro přípravu směsných půd byl použit komerční zahradnický kompost, s vysokým obsahem humusu, od firmy AGRO. Tento kompost se vyrábí zkompostováním surovin rostlinného původu a je do něj přidáván dolomitický vápenec. V informacích udávaných výrobcem je uvedeno, že pH kompostu se pohybuje v rozmezí 6–8,5, relativní vlhkost kompostu by se měla pohybovat od 40 do 65 %. Pro diplomovou práci byly použity 2 balení tohoto substrátu, kompost z prvního balení měl relativní vlhkost 56 %, kompost z druhého balení 66 %. Organický podíl kompostu byl stanoven jako 82,37 %, zbylý anorganický podíl tvořil 17,63 %. Při elementární analýze bylo stanoveno následující zastoupení prvků: C –  $36,2 \pm 0,2$  %, H –  $3,73 \pm 0,08$  %, N –  $0,55 \pm 0,02$  % a S –  $0,10 \pm 0,03$  %.

#### Směsná půda

Směsná půda byla připravena smícháním 1,42 l zemědělské jílové půdy, která představovala přirozené půdní mikrobiální oživení do 7,08 l komerčního zahradnického kompostu, tento poměr byl zvolen na základě výsledků předchozích diplomových a bakalářských prací<sup>20</sup>. Do půdy bylo přidáno pro upravení vlhkosti a přínosu základních minerálních prvků zvolené množství biomédia (100 ml biomédia na 1 l půdy). Takto připravená

půda byla po dobu 7, později 14 dnů, za mechanického provzdušňování prováděného v intervalu 24 hodin, ponechána aklimatizaci pro lepší pomnožení přítomných půdních mikroorganismů.

### Aktivovaný kal

Aerobní aktivovaný kal přivezený z ČOV Malenovice byl nejprve zbaven hrubých nečistot jeho přelitím přes síto. Následně byl 3krát dekantován pitnou vodou a poté v děličce provzdušňován po dobu 24 hodin. Pro přípravu experimentu na přístroji Micro-Oxymax byla sušina upravena tak, aby její koncentrace v respiračních baňkách byla  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , potřebné množství kalu bylo tedy odstředěno při 3000 otáčkách za minutu. Po odstranění supernatantu byla usazená biomasa suspendována v potřebném množství biomé-  
dia.

## 5.4 Metoda stanovení biologického rozkladu v půdním prostředí

Stanovení biologického rozkladu daných vzorků bylo prováděno na uzavřeném laboratorním respirometru (viz kapitola 2.2.4). Do litrových lahví bylo dávkováno 500 ml směsné půdy pro slepý pokus. Pro měření rozkladu vzorku, bylo dávkováno 250 ml směsné půdy, následně byl do lahve zaveden vzorek o navážce 1 g, ten byl zasypan dalšími 250 ml směsné půdy. Na závěr byla aparatura s namazanými zábrusy, sestavena a zapojena tak, aby mohlo docházet k měření a zaznamenávání biologické spotřeby kyslíku softwarem přístroje.

### Vyhodnocení procenta biologického rozkladu dle BSK

$$D_{TSK} = \frac{BSK_{spec}}{TSK} \cdot 100 \quad \text{resp.} \quad D_{CHSK_{Cr}} = \frac{BSK_{spec}}{CHSK_{Cr}} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde:

$BSK_{spec}$  je biologická spotřeba kyslíku při rozkladu látky korigovaná o slepý pokus a vztážená na navážku substrátu  $[\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}]$

$CHSK_{Cr}$  je chemická spotřeba kyslíku zkoušené látky  $[\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}]$

$TSK$  je teoretická spotřeba kyslíku zkoušené látky  $[\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}]$

$D_{TSK}$  je procento biologického rozkladu v TSK [%]



$$TSK = \frac{16 \cdot (2 \cdot x + \left(\frac{1}{2} \cdot y - 3 \cdot u\right) - z)}{M(C_x H_y O_z N_u)} \quad (2)$$

Kde:

$x$  je počet uhlíků,  $y$  je počet vodíků,  $z$  je počet kyslíků,  $u$  je počet dusíků v molekule.

## 5.5 Metoda stanovení biologického rozkladu ve vodném prostředí s inokulem z AK

Měření biologického rozkladu vzorků ve vodném prostředí probíhalo na uzavřeném respirometru Micro Oxymax, který zaznamenává, pomocí IČ analýzy plynné fáze, produkci oxidu uhličitého. Do reakčních baněk byla umístěna navážka vzorku (10 mg), tak aby výsledná koncentrace byla  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , poté bylo do baňky pipetováno 45 ml bio-média a 5 ml inokula AK o sušině  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Aktuální koncentrace AK v reakčních baňkách byla  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Takto připravené baňky byly umístěny na patřičné pozice respirometru, utěsněny a zašrubovány.

### Vyhodnocení procenta biologického rozkladu dle $\text{CO}_2$

$$D_{\text{CO}_2} = \frac{m_{\text{C-CO}_2}}{m_{\text{teor.C-fólie}}} \cdot 100 \quad (3)$$

Kde:

$D_{\text{CO}_2}$	je procento biologického rozkladu	[%]
$m_{\text{C-CO}_2}$	je množství uhlíku vyprodukovaného při rozkladu substrátu vypočteného z produkce $\text{CO}_2$	[mg]
$m_{\text{teor.C-fólie}}$	je teoretické množství vyprodukovaného uhlíku při teoretickém celkovém rozkladu substrátu	[mg]

## 5.6 Ostatní stanovení

V rámci experimentální práce byla prováděna i další stanovení: stanovení sušiny půdy a kalové suspenze, stanovení pH půdy či kalové suspenze a stanovení uhlíku, proveden byl i mikrobiologický rozbor směsných půd. Pro vyhodnocení procenta degradace bylo nutné definovat maximální možnou míru oxidace použitých vzorků pomocí stanovení  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  pro jednotlivé použité polymery. Pro připravené polymerní směsi PVP/PLA a

PVP/PLA/kosubstrát byly pořízeny snímky na skenovacím elektronovém mikroskopu, byla pro ně měřena IČ spektra.

### Stanovení vlhkosti půdy

Na předem vysušené a zvážené Petriho misky bylo s přesností na 5 desetinných míst navažováno 5 g půdy, poté byly misky umístěny do sušárny, vyhřáté na 105 °C, a sušeny do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly misky umístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy. Vyhodnocení bylo provedeno dle vztahu (4).

$$\phi = \frac{m_V - m_S}{m_V} \cdot 100 \quad (4)$$

Kde:

$\phi$  je relativní vlhkost [%]

$m_V$  je hmotnost půdy před vysušením [g]

$m_S$  je hmotnost půdy po vysušení [g]

### Stanovení sušiny AK

Na předem vysušené a zvážené filtrační papírky (červená páska) bylo pipetováno 15 ml suspenze AK, poté byly filtrační papírky umístěny do sušárny, vyhřáté na 105 °C, a sušeny do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly filtry umístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy. Vyhodnocení bylo provedeno dle vztahu (5).

$$m_0 = \frac{m_1 - m_2}{V} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde:

$m_0$  je sušina AK [mg·l<sup>-1</sup>]

$m_1$  je hmotnost filtračního papírku s AK po vysušení [g]

$m_2$  je hmotnost prázdného filtračního papírku [g]

$V$  je objem pipetované suspenze kalu [l]

### Stanovení pH<sub>KCl</sub> – půdní výměnná kapacita

Stanovení pH bylo prováděno potenciometricky na laboratorním přístroji pH/mV/ION 735, Ion Lab WTW. Měření bylo ve výluhu z půdy. Ten byl připraven navá-

žením cca 20 g směsné půdy do Erlenmayerovy baňky, k půdě bylo přidáno 50 ml 0,2 M roztoku KCl a skleněnou tyčinkou byla půda v roztoku řádně rozmíchána. Měření pH bylo prováděno po  $24 \pm 4$  hodinách od přípravy výluhu.

### **Stanovení pH suspenze aktivovaného kalu**

Stanovení pH bylo prováděno potenciometricky na laboratorním přístroji pH/mV/ION 735, Ion Lab WTW.

### **Základní mikrobiologický rozbor směsné půdy**

Při mikrobiologickém rozboru byl stanoven celkový počet chemoorganotrofních bakterií, počet vláknitých plísní a aktinomycet, zároveň byl pozorován výskyt bakterií rodu *Azotobacter*. Pro tyto účely byly připraveny následující typy živných půd:

- TYA agar (chemoorganotrofní bakterie),
- Glycerol-dusičnanový agar (aktinomycety),
- Půdní agar s Bengálskou červení a chloramfenikolem (vláknité plísně),
- Ashbyho agar (*Azotobacter*).

Do 50 ml sterilního suspenzačního roztoku bylo naváženo 5 g půdy, takto připravená suspenze byla ponechána 15 minut na třepačce. Po vytřepání se nechala půda asi 5 minut odsedimentovat a supernatant byl ředěn pomocí zkumavek s 4,5 ml fyziologického roztoku až do potřebného zředění. Na misky s živnou půdou bylo pipetováno 100  $\mu$ l suspenze z příslušných zkumavek. Při stanovení výskytu bakterií rodu *Azotobacter* bylo na živnou půdu přímo naváženo 200 mg směsné půdy. Všechna inokula byla rozetřena po povrchu živného média sterilní skleněnou tyčinkou. Inkubace probíhala při 20–30 °C v případě chemoorganotrofních bakterií po dobu 5 dnů a u ostatních po dobu 7 dnů.

### **Stanovení TOC**

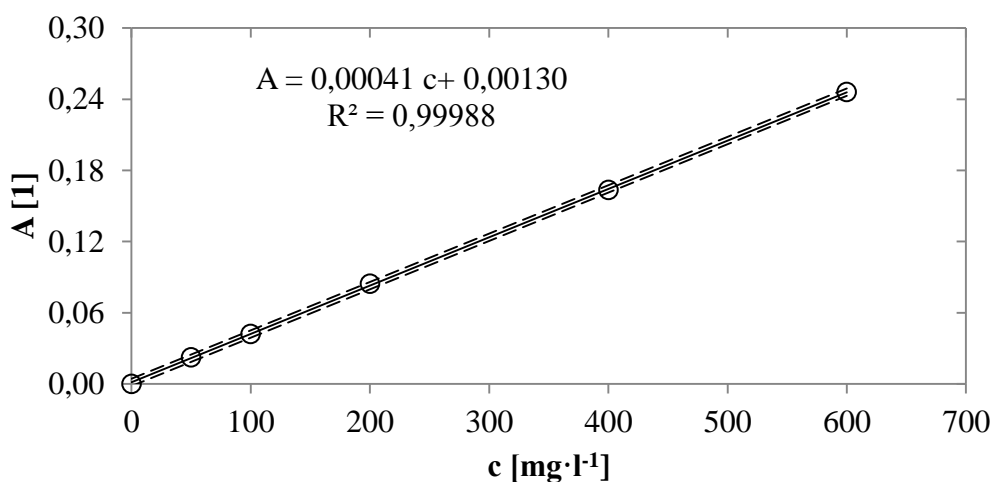
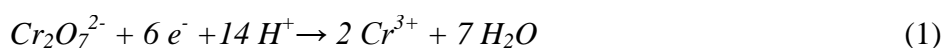
Stanovení celkového organického uhlíku bylo prováděno na automatickém analyzátoru Shimadzu TOC 5000 A. V analyzátoru dochází po nadávkování vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při 680 °C k oxidaci veškerého uhlíku v něm obsaženém, na oxid uhličitý. Oxid uhličitý je veden do NDR detektoru, kde dochází k zaznamenání signálu, který je vyhodnocen jako plocha píku přímo úměrná koncentraci uhlíku ve vzorku.

### Skenovací elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie je optickou metodou, v níž zdroj fotonů z klasické světelné mikroskopie nahrazuje proud elektronů a skleněné čočky elektromagnetické čočky. Na elektronovém mikroskopu byly pořízeny snímky povrchu námi připravených fólií z polymerní směsi PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát. Princip elektronové mikroskopie spočívá v tom, že na pozorovaný vzorek je soustředěn paprsek elektronů, při jejich interakci dochází ke změnám úrovně signálu a odrazu sekundárních elektronů, které jsou zaznamenávány detektorem. Na základě těchto změn signálů je vyhodnocen výsledný obraz. Nevodivé vzorky je třeba před vlastním pozorováním pokrýt vrstvou kovu, nejčastěji se pro tyto účely používá zlato.

### Stanovení $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$

$\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  polymerů byla stanovena modifikovanou dvojjchromanovou metodou prováděnou v uzavřeném systému (zkumavkách). Pro vzorky polymerů rozpustných ve vodě byly připraveny roztoky o vhodné koncentraci,  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  pro nerozpustné vzorky byla stanovena metodou přímé navážky, té bylo docíleno na mikrováhách. Po dvouhodinovém varu systému vzorek, oxidační a katalyzátorový roztok, se měřila absorbance vznikajícího  $\text{Cr}^{3+}$ .  $\text{Cr}^{3+}$  je produkován při oxidaci organické látky za současné redukce  $\text{Cr}^{6+}$ , proces znázorňuje rovnice 1. Absorbance byla měřena na přístroji Hach při 600 nm.  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  bylo vyhodnoceno metodou kalibrační křivky, kalibrační křivka použitá pro vyhodnocení je uvedena na obrázku 14.



Obrázek 14 Kalibrační přímka s intervalem spolehlivosti pro stanovení  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  v rozsahu 0–600  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Tabulka 5 Vyhodnocení experimentálně stanoveného  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  pro samotné polymery a teoretické  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  pro polymerní směsi-fólie (dle navážek)

PVP	1730 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PVP/PLA	1337 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
PLA	1007 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		
NMP	1662 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PVP/PLA/NMP	1240 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
OP	2120 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PVP/PLA/OP	1388 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
APhA	1831 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PVP/PLA/APhA	1227 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
AC	1223 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PVP/PLA/AC	1214 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

### Měření IČ spekter

Měření spekter fólií polymerních směsí bylo prováděno na přístroji FTIR-ATR Nicolet iS10. Rozsah měření byl zvolen v oblasti 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Tato metoda slouží pro identifikaci látek a spočívá v interakci vzorku s infračerveným zářením. Část infračerveného záření je absorbována vzorkem a část jím prochází (transmise). Absorpce záření způsobuje změny rotačně vibračních stavů molekuly. Výsledkem měření je graf funkční závislosti energie na převrácené hodnotě vlnové délky záření (vlnočet). Vzniklé spektrum tvoří píky charakteristické pro dané funkční skupiny látky.

Vzhledem k nehomogenitě směsných fólií bylo přistoupeno na měření IČ spekter formou KBr tabletek, které byly připravovány navážením 0,180 g KBr a 0,0010 g fólie na Petriho misku, poté byl na Petriho misku pipetován 1 ml chloroformu, aby došlo k rozpuštění fólie, následně byla důkladně promíchaná směs ponechána volně v digestoři, aby došlo k vytěkání chloroformu. Zbylý prášek byl pečlivě rozetřen v achátové mističce a na lisu byla vyrobena tabletky pro měření na FTIR. Měření bylo prováděno oproti čisté tabletce KBr.

### Test rozpustnosti

Rozpustnost fólií byla sledována v pětidenním testu. Do Erlenmayerových baněk s daným množstvím destilované vody byly aplikovány vzorky fólií, předem vysušené a zvážené na analytických vahách, hmotnost fólií byla cca 40 mg. Množství rozpuštěného PVP bylo hodnoceno odběrem vzorků ve zvolených intervalech a následnou analýzou vzorků na automatickém analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC 5000 A.

### Test nasákavosti

Testování fólií na nasákavost bylo prováděno v exsikátoru s relativní vlhkostí vzduchu 54 %, kterou zajišťoval nasycený roztok  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ . Do exsikátoru byly na Petriho miskách umístěny předem vysušené a na analytických vahách zvážené fólie o rozměrech 2,5 x 2,5 cm. Stanovení nasákavosti bylo prováděno gravimetricky na analytických vahách po 24 hodinových intervalech.

### Elementární analýza CHNS/O půd

Elementární analýza CHNS/O byla provedena na analyzátoru Flash EA 1112. Stanovení těchto základních prvků bylo provedeno pro vzorek zemědělské půdy jílového typu a komerční zahradnický kompost, ty byly před analýzou vysušeny při 105 °C. Při analýze se zpravidla pracuje s 2–3 mg navázkou vzorku, zvážené na mikrováhách s přesností na 6 desetinných míst. Vlastní stanovení se provádí pro  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{SO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , ty vznikají při dokonalém spalování vzorku v atmosféře kyslíku při teplotách až 1050 °C. Směs spalin je poté vedena do vyhřáté křemenné trubice obsahující katalyzátor a absorbent přebývajícího kyslíku. Separaci zajišťuje chromatografická náplňová kolona s tepelně vodivostním detektorem.

## 5.7 Příprava polymerních směsí PVP/PLA

Polymerní směsi PVP/PLA byly připraveny dle postupu, který uvádí publikace de Pauly<sup>39</sup>, vzhledem k nejúspěšnějšímu rozkladu polymerní směsi PVP/PLA (50/50), byl zvolen pro diplomovou práci právě tento poměr. Nejprve byl připraven 10% (v/v) roztok PLA v chloroformu, navážením potřebného množství polymeru do reakční baňky. Poté byl do baňky pipetován daný objem chloroformu, takto připravená směs byla 6 hodin míchána na magnetickém míchadle až do úplného rozpuštění PLA. 10% (v/v) roztok PVP byl připraven navážením potřebného množství polymeru do reakční baňky, do baňky byl pipetován daný objem chloroformu a směs byla 2 hodiny míchána na magnetickém míchadle. Připravené roztoky polymerů byly smíchány tak, aby poměr polymerů v celkové směsi byl 1:1. Vzniklá polymerní směs se ještě poté nechala 2 hodiny promíchat, aby došlo k řádné homogenizaci v celém objemu. Po promíchání byla polymerní směs vylita na skleněnou Petriho misku a ponechána do dalšího dne v digestoři, aby došlo k odpaření chloroformu. Takto vzniklá fólie byla po sejmutí z Petriho misky ponechána volně a později v exsikátoru sušit do konstantní hmotnosti.

Mimo fólie ze samotné polymerní směsi PVP/PLA (50/50), byly připravovány také fólie s přísádky látek – „kosubstrátů“. Tyto kosubstráty byly přidávány k polymerní směsi PVP/PLA v rozsahu 1 % (v/v) původní připravované polymerní směsi PVP/PLA (50/50) stejným postupem uvedeným výše. Přísádky těchto látek měly vliv na vzhled i pevnost jednotlivých fólií.

Pro testování byla připravena odlitím také fólie samotné PLA, ta byla připravena z jejího 10% (v/v) roztoku v chloroformu. Stejně tak byl připraven i 10% (v/v) roztok samotného PVP, ten ovšem nevytvořil kompaktní fólii, respektive nebylo možné jej po této úpravě ze skleněné Petriho misky sejmout a tak byly použity pro testování jeho degradace získané fragmenty.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 6 BIOLOGICKÝ ROZKLAD NEUPRAVENÉHO VZORKU PVP V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ

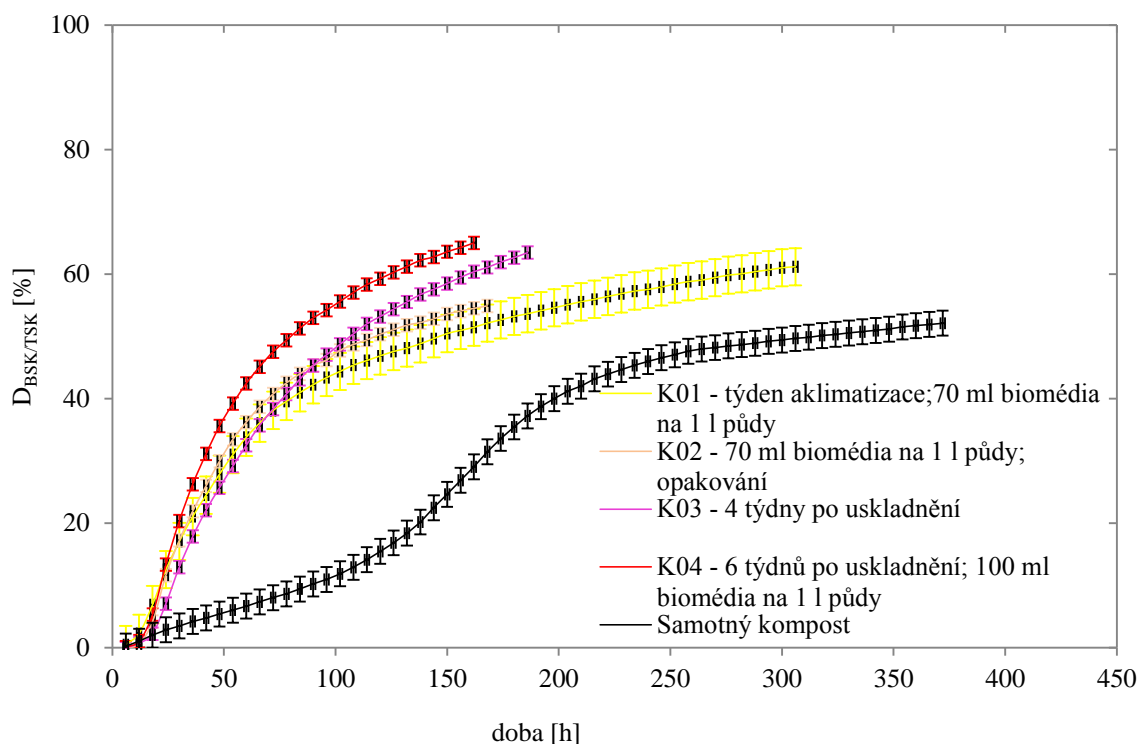
Prvním cílem diplomové práce bylo ověřit mikrobiální rozklad samotného neupraveného vzorku PVP K15 o molekulové hmotnosti  $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  v půdním prostředí a doplnit tak sérii již provedených diplomových prací o další informaci týkající se možného biologického rozkladu PVP. Měření biologického rozkladu bylo prováděno na laboratorním respirometru BI 2000, který zaznamenává biologickou spotřebu kyslíku. Půdní prostředí bylo simulováno směsnou půdou připravenou ze zemědělské půdy „jarní“ odběr a prvního balení komerčního zahradnického kompostu. Před vlastním zahájením pokusů zabývajících se rozkladem PVP byly prováděny doplňující experimenty, zjišťující základní mikrobiální aktivitu směsných půd tak, že do nich byla aplikována standardní látka – glukóza, o které je známo, že je rozkládána poměrně snadno a rychle. Tato mikrobiální aktivita půdy byla sledována během jejího uskladnění v průběhu celé diplomové práce. Před zahájením těchto hlavních pokusů byl pro připravenou směsnou půdu proveden také základní mikrobiologický rozbor. Stanoven byl počet chemoorganotrofních aerobních bakterií  $8,2 \cdot 10^6\text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ , dále počet aktinomycet  $1,3 \cdot 10^5\text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  a počet půdních vláknitých plísní  $1,6 \cdot 10^4\text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ . Výskyt mikroorganismů rodu *Azotobacter* nebyl pozorován.

### 6.1 Sledování mikrobiální aktivity „jarního“ odběru půdy

Měření biologického rozkladu glukózy bylo prováděno taktéž na laboratorním respirometru BI 2000. Pro jednotlivé experimenty byla stanovena relativní vlhkost půdy a  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  před a po zahájení pokusu. V půdě nedocházelo k žádným zásadním změnám  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ , které se standardně pohybovalo mezi 5,5–6, můžeme tedy vyloučit, že by během experimentů docházelo k významným chemickým reakcím. Relativní vlhkost půdy byla také v průběhu měření zachována. Z naměřených hodnot BSK za rozkladu glukózy byly sestrojeny křivky biologického rozkladu, z nich byly odečteny a vyhodnoceny následující parametry. Byla stanovena doba rozkladu a míra degradace glukózy. Vyhodnocení míry degradace substrátu bylo prováděno dle vztahu (1) z kapitoly 5.4. Stanoveny byly také maximální rychlosti rozkladu a čas, v němž k maximální rychlosti degradace docházelo. Tyto parametry poskytly lepší představu o schopnosti rozkladu substrátu mikrobiálními kulturami v jednotlivých půdách. Dalším stanoveným parametrem byla míra rozkladu v určitém časovém úseku, kterým byla zvolena doba tří dnů (72 hodin). Míra rozkladu

glukózy byla měřena i v samotném komerčním zahradnickém kompostu (KK). Výsledky testů potvrdily výhodnost podpoření mikrobiálního osídlení přípravou směsných půd.

Směsná půda, připravená dle postupu z kapitoly 5.4, byla u prvních experimentů (Obrázek 15; K01–K04) zjišťujících její mikrobiální aktivitu za rozkladu standardní látky – glukózy, ponechána aklimatizaci 7 dní. Pro úpravu její vlhkosti bylo použito 70 ml biomédia na 1 litr půdy. První experimenty (K01, K02) byly prováděny v době přibližně 1 měsíce od začátku uskladnění půdy. Půda byla uskladněna při laboratorní teplotě v uzavřené nádobě pro zachování vlhkosti a zabránění kontaminaci. Mikrobiální aktivita byla v této době poměrně vysoká, k rozkladu substrátu došlo víceméně rychle (Obrázek 16). Již po 72 hodinách byl biologický rozklad glukózy kolem 40 %.



Obrázek 15 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „jarního“ odběru zemědělské půdy

Další měření mikrobiální aktivity půdy (K03) bylo provedeno v době již 6 týdnů po uskladnění, došlo k mírnému snížení maximální rychlosti rozkladu, míra degradace glukózy po třech dnech experimentu byla také nižší (Tabulka 6). U předchozích měření (K01–K03) se ale vlhkost půdy pohybovala kolem 48 %, pro další pokus K04 byl změněn postup přípravy směsné půdy, pro úpravu vlhkosti byla zvýšena dávka biomédia na 100 ml na 1 l půdy, čímž jsme dosáhli, že vlhkost půdy byla již požadovaných 50 %. Tento krok se z průběhu křivek degradace glukózy a zvýšením maximální rychlosti rozkladu zdál být

účinný, a tak byl tento postup realizován při přípravě experimentu zabývajícího se již rozkladem samotného PVP.

Tabulka 6 Parametry stanovené z průběhu křivek biologického rozkladu glukózy I

MĚŘENÍ	$t_{rozkl}$ [h]	$D_{72}$ [%]	$D_{BSK/TSK}$ [%]	$t_{max}$ [hod]	$V_{max}$ [mg O <sub>2</sub> ·hod <sup>-1</sup> ]
KK	204	8	52 ± 2	150	0,03
K01	180	38	61 ± 3	24	0,43
K02	101	41	55 ± 2	25	0,51
K03	114	38	63 ± 2	30	0,36
K04	100	49	65 ± 1	24	0,63

Pozn.:

„K“ = kontrolní pokus,

„KK“ = kontrolní pokus pro samotný kompost pro srovnání,

K – „číslo pokusu“ = pořadí experimentů odpovídající časovému průběhu diplomové práce.

Kde:

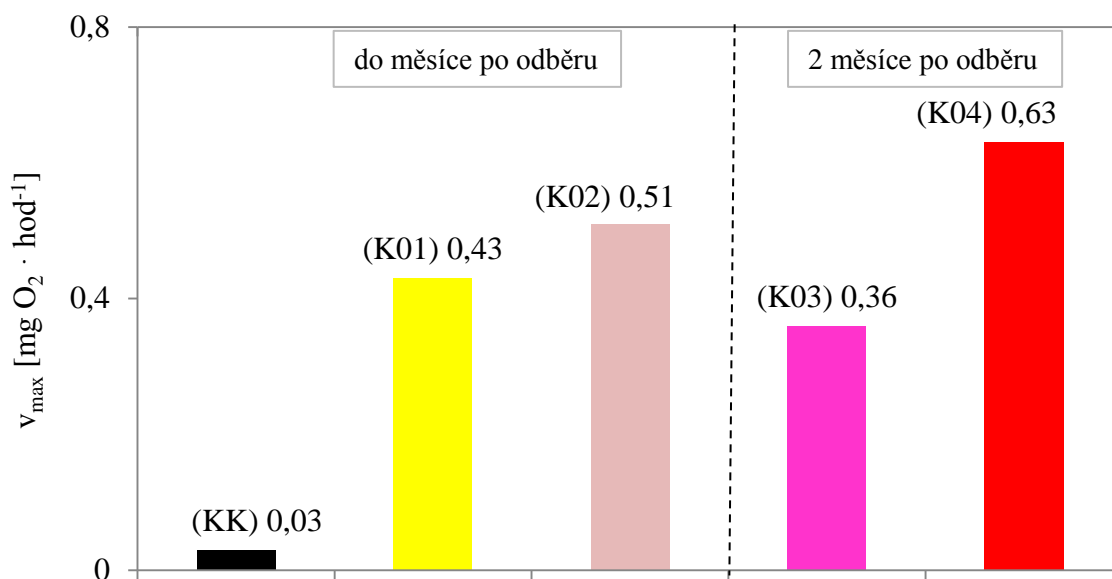
$D_{72}$  je % max. stupně rozkladu v čase 72 hodin od zahájení pokusu [%]

$D_{BSK/TSK}$  je max. stupeň rozkladu [%]

$t_{rozkl}$  je doba rozkladu substrátu [h]

$t_{max}$  je doba, kdy bylo dosaženo maximální rychlosti rozkladu [hod]

$V_{max}$  je maximální rychlost rozkladu glukózy [mg O<sub>2</sub>·hod<sup>-1</sup>]



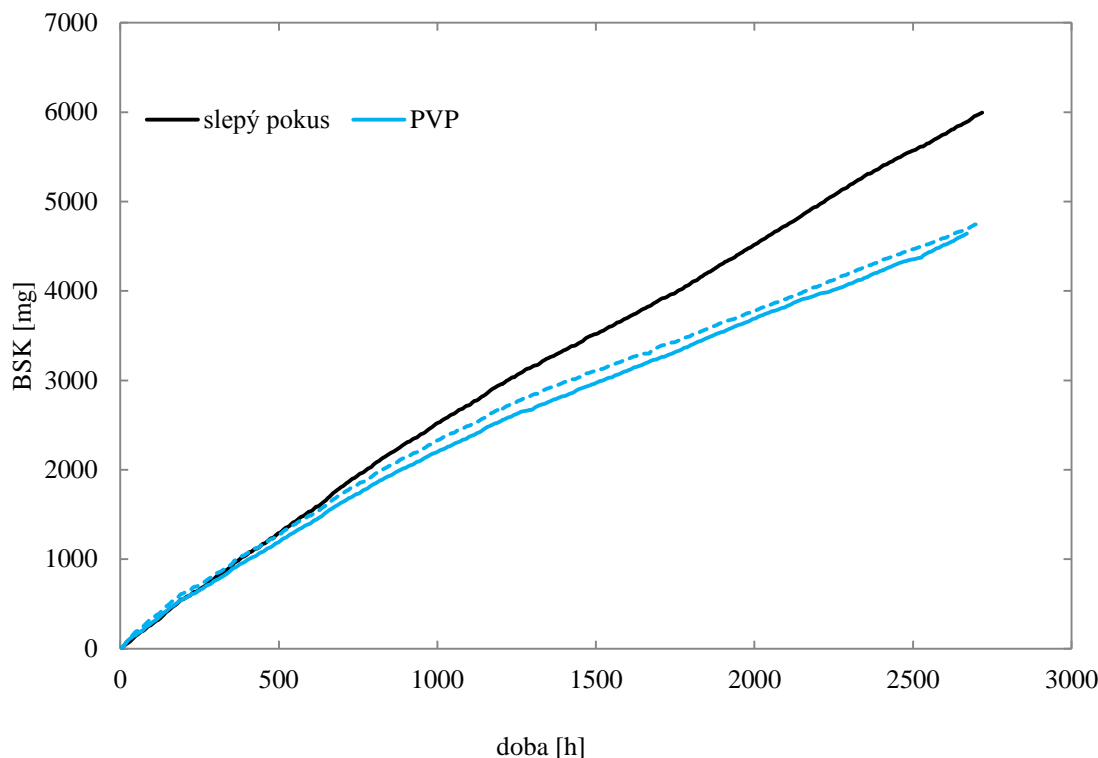
Obrázek 16 Maximální rychlosti rozkladu glukózy pro experimenty K01–K04; aklimatizace půdy 7 dní pro všechna měření

Průběhy všech provedených měření jen potvrzují heterogenitu a proměnlivost půdního prostředí (Obrázek 16, Tabulka 6), a proto v této práci jsou výsledky diskutovány vždy v rámci jednoho experimentu, neboť na základě získaných dat nelze srovnávat výsledky dvou různých testů.

## 6.2 Vyhodnocení biologické rozložitelnosti PVP v půdním prostředí

Na základě výsledků testování mikrobiální aktivity půdy, bylo zahájeno měření rozkladu samotného neupraveného vzorku PVP K15 o molekulové hmotnosti 10 000 g · mol<sup>-1</sup>. Směsná půda pro experiment obsahovala 100 ml biomédia na 1 l půdy, čímž byla zajištěna 50% vlhkost půdního prostředí, aklimatizace směsné půdy byla 7 dní.

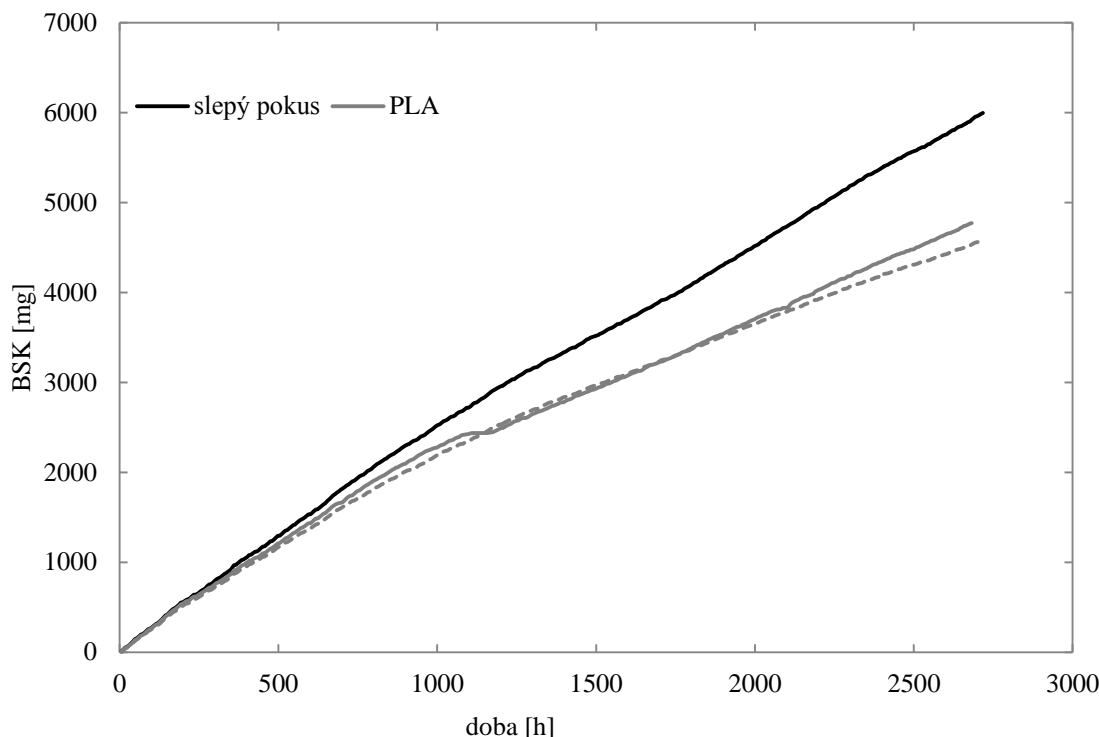
Doba experimentu biologické rozložitelnosti PVP byla 84 dnů. Nedošlo při něm k žádným výkyvům relativní vlhkosti půdy. Nedošlo ani k výkyvům pH<sub>KCl</sub>, které by mohly informovat o možných chemických reakcích provázejících rozklad PVP, či o nedostačující difúzi CO<sub>2</sub>, který by při hromadění ve spodní části reakční lahve mohl způsobovat značné okyselení prostředí. Z křivek průběhu naměřeného BSK respirometrem můžeme vidět, že se hodnoty ze začátku experimentu pohybovaly mírně nad úroveň slepého pokusu (Obrázek 17). Rozklad dosahoval po 162 hodinách měření 3 %, což odpovídá výsledkům práce Vyoralové<sup>25</sup>, která studovala rozklad PVP v zahradnickém kompostu. V práci Vaškové<sup>7</sup> docházelo k rozkladu PVP 6,5 %, nicméně v jejím případě byla použita pro rozklad půda lesního typu, která má zajisté bohatší mikrobiální oživení.



Obrázek 17 Naměřené BSK v průběhu studia biologického rozkladu PVP

Námi zaznamenané procento degradace nelze považovat za významné, neboť může docházet k degradaci nečistot obsažených v polymeru PVP, které v něm zůstaly z procesu jeho výroby. Nicméně v průběhu celého experimentu docházelo k poklesu BSK oproti endogenní respiraci. Tento průběh může být způsoben sorpcí PVP na půdní částice, vyloučit nelze ani tvorbu komplexů PVP s půdními složkami či mikrobiálními enzymy, v důsledku kterých může docházet k zaznamenané inhibici. Nelze vyloučit ani možnost primárního rozkladu PVP, který vede k tvorbě metabolitů inhibujících půdní mikroorganismy. Tuto teorii by bylo nutno potvrdit řadou dalších experimentů, například odebrat po 162 hodinách experimentu vzorek půdy a podrobit jej po extrakci analýze gelovou permeační chromatografií.

Vzhledem k plánovaným experimentům byl v rámci tohoto pokusu pozorován i rozklad samotného polymeru PLA (Obrázek 18), z grafu je zřejmé, že k rozkladu PLA v půdě po dobu 84 dnů nedochází stejně jako v práci Okhity<sup>38</sup> a jiných. PLA byla do půdy dávkována ve formě granulí, což mohlo být důvodem ztížení přístupu tohoto substrátu mikrobiálními kulturám. Je známo, že biologický rozklad PLA lze podpořit zvýšením teploty a dostatečnou hydrolýzou polymeru.



Obrázek 18 Naměřená BSK v průběhu studia biologického rozkladu PLA

Naměřená BSK při rozkladu PLA měla poněkud neočekávaný průběh, který poukázal na možnou inhibici mikroorganismů, ta ovšem v literatuře není popsána. S dobou experimentu docházelo k výraznému poklesu BSK oproti endogenní respiraci. Bylo tedy zvažováno, zda nemůže být tento průběh důsledkem chyby v metodice měření, tato myšlenka byla vyvrácena následnými experimenty prováděnými s inertními materiály, data tohoto experimentu v práci nejsou prezentována. Další možnou příčinou tohoto průběhu by mohla být hydrolýza PLA, při níž by mohlo docházet k uvolňování produktů, jež by mohly mikroorganismy skutečně inhibovat, neboť pro testování byla zvolena relativně vysoká navážka vzorku a to 1 g. Bylo by třeba provést další měření, která by tuto domněnku mohla potvrdit či vyvrátit, například podrobit vzorky PLA před zahájením a po ukončení experimentu testům na GPC, čímž by se prokázalo, zda dochází ke snížení molekulové hmotnosti polymeru či nikoliv. Pomocí FTIR byla provedena analýza granulí PLA původních a granulí PLA, které byly uloženy po dobu 84 dní v půdním prostředí. Na IČ spektrech však nebyly pozorovány žádné výrazné změny.

## 7 BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST PVP V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ ADAPTOVANÉM NA KOSUBSTRÁT

Vzhledem k tomu, že samotné PVP biologickému rozkladu nepodléhalo, bylo přistoupeno k možnosti jeho případný biologický rozklad podpořit. A to adaptací prostředí na kosubstrát, tento postup byl již proveden v diplomové práci Červenákové<sup>22</sup>, nicméně ta adaptovala na kosubstrát vodné prostředí s inokulem AK z ČOV Malenovice.

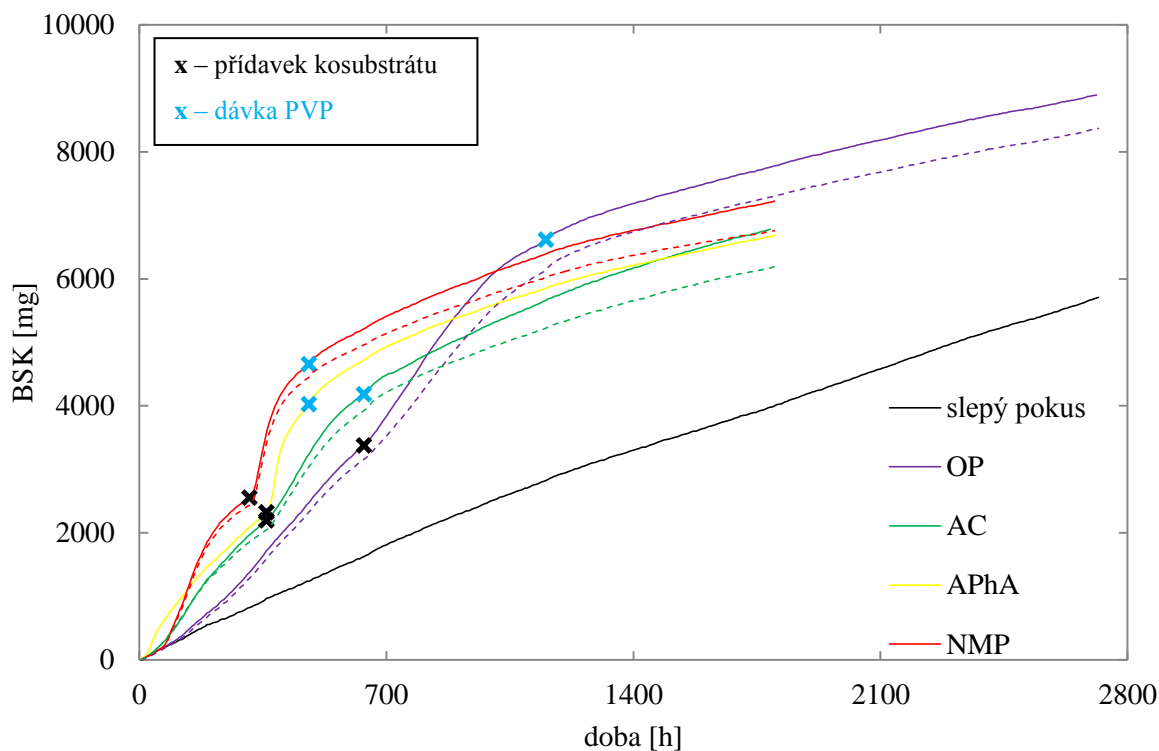
Kosubstráty byly zvoleny jednak strukturní analogy PVP, a to OP a NMP, ale také AC a APhA, neboť při pokusech s nimi byly v předchozích diplomových pracích zaznamenány pozitivní výsledky. Při testech rozkladu PVP za podpoření kosubstrátu byl zvolen postup adaptace půdního prostředí. Testování probíhalo ve stejném typu směsné půdy jako rozklad samotného PVP. Měření bylo prováděno opět na laboratorním respirometru BI 2000. Experiment probíhal 84 dnů.

Nejprve byla provedena adaptace prostředí na jednotlivé kosubstráty. Do směsné půdy byla zavedena první dávka (1 g) daného kosubstrátu, její rozklad probíhal poměrně rychle až na OP, u kterého byla zaznamenána cca 8 denní lagová fáze (Tabulka 7). Těsně před úplným rozkladem, kdy mikroorganismy již vytvořily enzymatický aparát potřebný pro rozklad kosubstrátu, byla do půdy zavedena druhá dávka kosubstrátů, čímž se ověřila adaptace prostředí. Během adaptace došlo v půdním prostředí k vytvoření základního specifického enzymatického vybavení přítomných mikrobiálních kultur, které mělo podpořit rozklad PVP.

Do takto připravené adaptované půdy byla již aplikována dávka (1 g) PVP K15. V průběhu experimentu nedocházelo k významným změnám relativní vlhkosti půdy, až na OP a stejně tomu tak bylo i při stanovení  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ . Vyhodnocení měření bylo prováděno dle vztahu (1). Uvedené hodnoty degradace odpovídají maximální degradaci, jíž bylo dosaženo, ovšem v závěru experimentu se hodnoty BSK pohybovaly pod úrovní slepého pokusu. To dokazují klesající hodnoty  $\text{BSK}_{\text{spec}}$  v čase (Obrázek 20), které se v závěru experimentu pohybovaly pod úrovní slepého pokusu. K poklesu respirace došlo až po přidavku PVP. Průběh naměřeného BSK pro jednotlivá měření uvádí obrázky 19 a 20.

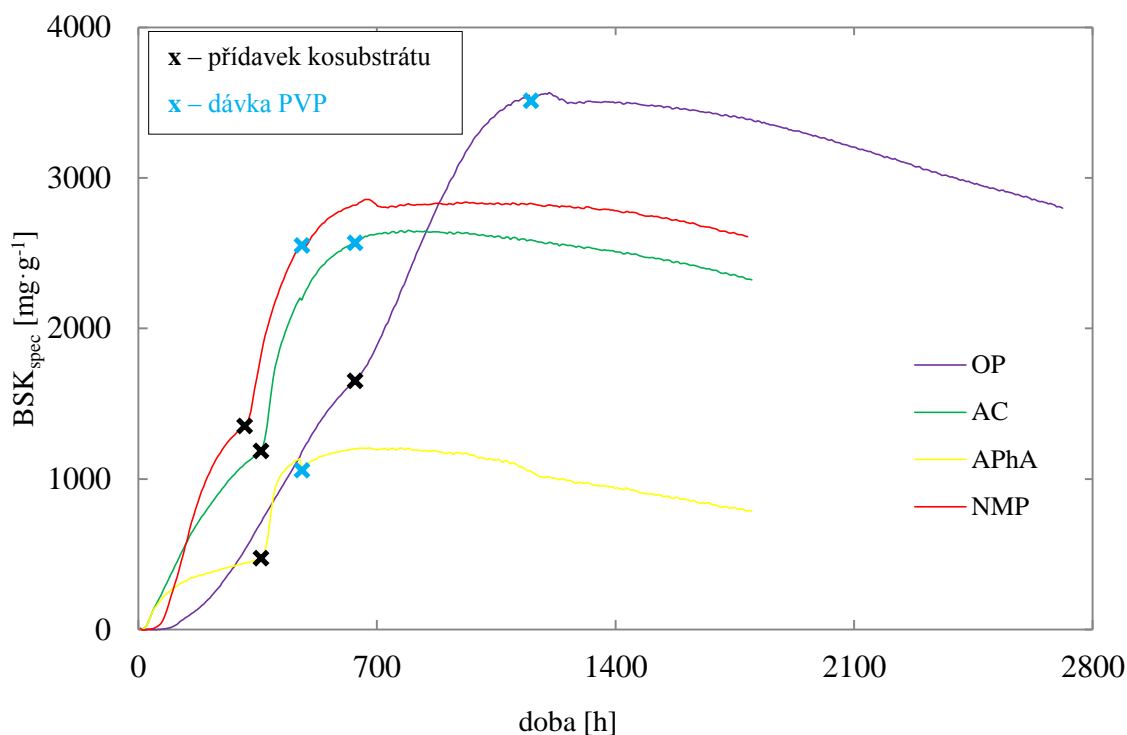
Při adaptaci půdního prostředí na kosubstrát nebyl pozorován výrazný vliv vzniklého enzymatického vybavení mikrobiálních kultur za rozkladu kosubstrátu na rozklad PVP. Srovnáme-li hodnoty degradace samotných kosubstrátů s celkovou mírou degradace (Tabulka 7), 40% pokles hodnot značí, že k biologickému rozkladu PVP nedocházelo.

Rozklad PVP byl zaznamenán pouze na jedné pozici respirometru v případě adaptace prostředí na akrylamid. Zaznamenán byl rozklad PVP 7 %, k němuž došlo do 3 dnů od přidavku PVP (66 hodin), výsledek je ovšem zavádějící, taktéž se jedná o maximální dosažené hodnoty při měření respirace. V práci Vaškové<sup>7</sup> byl vliv akrylamidu pozorován, u ní docházelo k rozkladu PVP 21 %, ačkoliv v její práci byl PVP dávkován přímo ve směsi PVP (1:1), je nutno podotknout, že ve své práci použila i jiný typ půdy, konkrétně lesní půdu. Významný vliv APhA na rozklad PVP, který byl pozorován v práci Vyoralové<sup>25</sup>, nebyl potvrzen. Mírné výkyvy na křivkách  $BSK_{spec}$  jsou způsobeny zřejmě manipulací s přístrojem.



Obrázek 19 Naměřená BSK v průběhu studia experimentu při rozkladu PVP v adaptovaném půdním prostředí na jednotlivé kosubstráty





Obrázek 20 Průměrný průběh BSK korigovaný o slepý pokus a vztažený na ná-  
vážku vzorku; tj,  $BSK_{spec}$  v čase

Tabulka 7 Vyhodnocení % degradace PVP v půdě adaptované na kosubstrát

kosubstrát	$t_{lag_0}$ [h]	$\emptyset D_{kos(1.př.)}$ [%]	$\emptyset D_{kos(2.př.)}$ [%]	$BSK_{max}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	$CHSK_{celk}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	$D_{celk}$ [%]
OP	198	77	90	3549	5970	59
NMP	86	98	98	3338	5054	66
AC	78	92	96	2510	4176	60
APhA	36	61	77	2749	5392	51

Kde:  $t_{lag_0}$  je doba lagové fáze při rozkladu první dávky kosubstrátu [h]

$BSK_{max}$  je maximální naměřená hodnota  $BSK_{spec}$  [ $mg \cdot g^{-1}$ ]

$CHSK_{celk}$  je celková CHSK substrátu na dané pozici [ $mg \cdot g^{-1}$ ]

$D_{celk}$  je celkový rozklad substrátů v adaptované půdě [%]

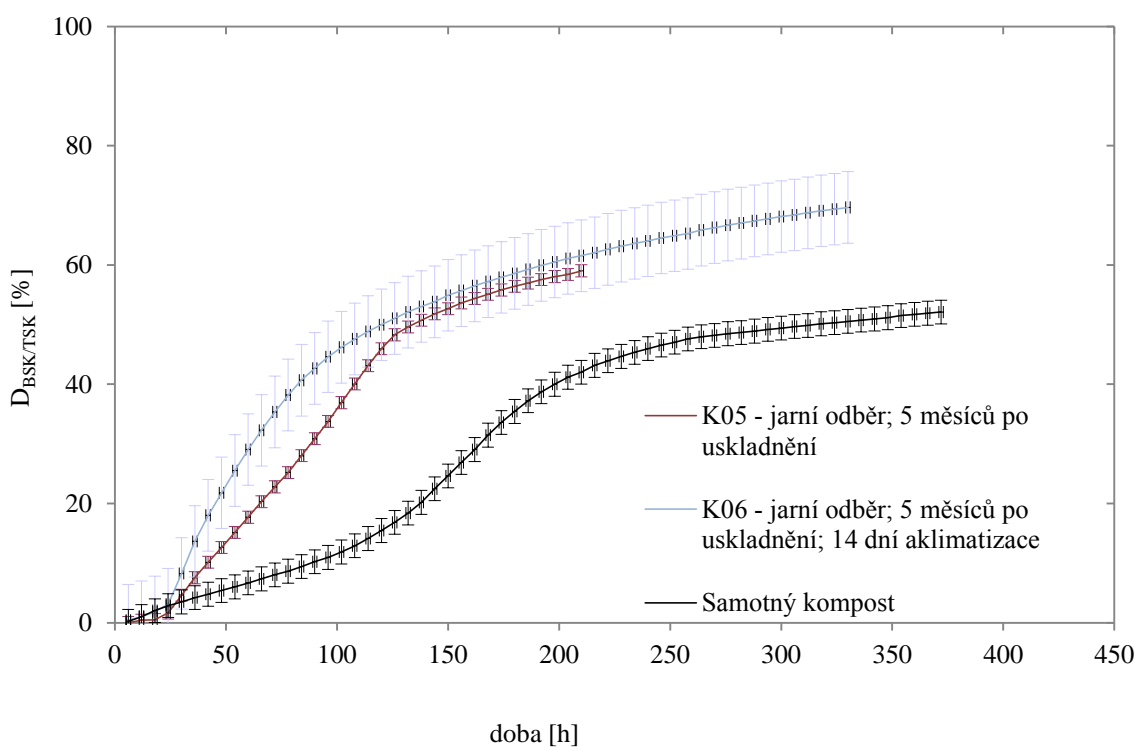
$\emptyset D_{kos(1.(2.) př.)}$  je rozklad kosubstrátu po prvním (druhém) přidavku [%]

## 8 BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST SMĚSNÉHO POLYMERU PVP/PLA (50/50)

Dalším cílem diplomové práce bylo ověřit výsledky publikované de Paulou<sup>39</sup>, který prezentoval významnou degradaci polymerní směsi PVP/PLA. Oba tyto polymery, jak vyplývá z literární rešerše a provedených experimentů, jsou obtížně biologicky rozložitelné. Byla tedy připravena série směsných fólií PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát. Jejich možná biologická degradace byla pozorována v půdním prostředí a testy byly doplněny experimentem zkoumajícím jejich biologický rozklad ve vodném prostředí s inokulem z AK z ČOV Malenovice.

### 8.1 Sledování mikrobiální aktivity „podzimního“ odběru půdy

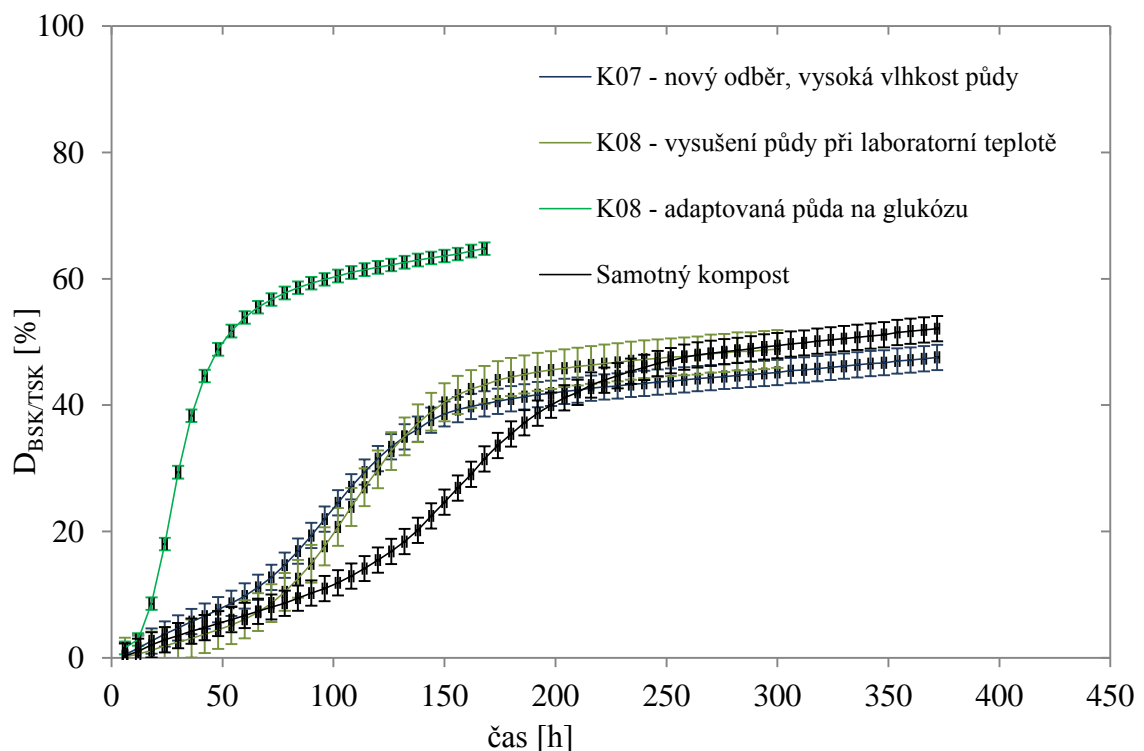
Před zahájením „hlavního“ experimentu, bylo provedeno další testování půdy na mikrobiální aktivitu, nicméně aktivita směsné půdy, připravené ze zemědělské půdy „jarní“ odběr se po 5 měsících uskladnění výrazně snížila, rozklad glukózy po třech dnech experimentu byl jen 25 % (Obrázek 21; K05) a maximální rychlost rozkladu glukózy se snížila o 30 %.



Obrázek 21 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „jarního“ odběru zemědělské půdy po 5 měsících uskladnění

Na základě tohoto pozorování bylo přistoupeno k prodloužení doby aklimatizace mikrobiálních kultur v půdě ze 7 na 14 dní. Prodloužením doby aklimatizace došlo zřejmě k vyššímu pomnožení mikroorganismů, což způsobilo rychlejší rozklad glukózy, rozklad glukózy v třídním intervalu se zvýšil o 10 % (Obrázek 21; K06). Avšak ani tím nebylo dosaženo uspokojivých výsledků, a vzhledem k tomu, že zásoby zemědělské půdy „jarní“ odběr byly téměř vyčerpány, bylo tedy nutné provést další odběr.

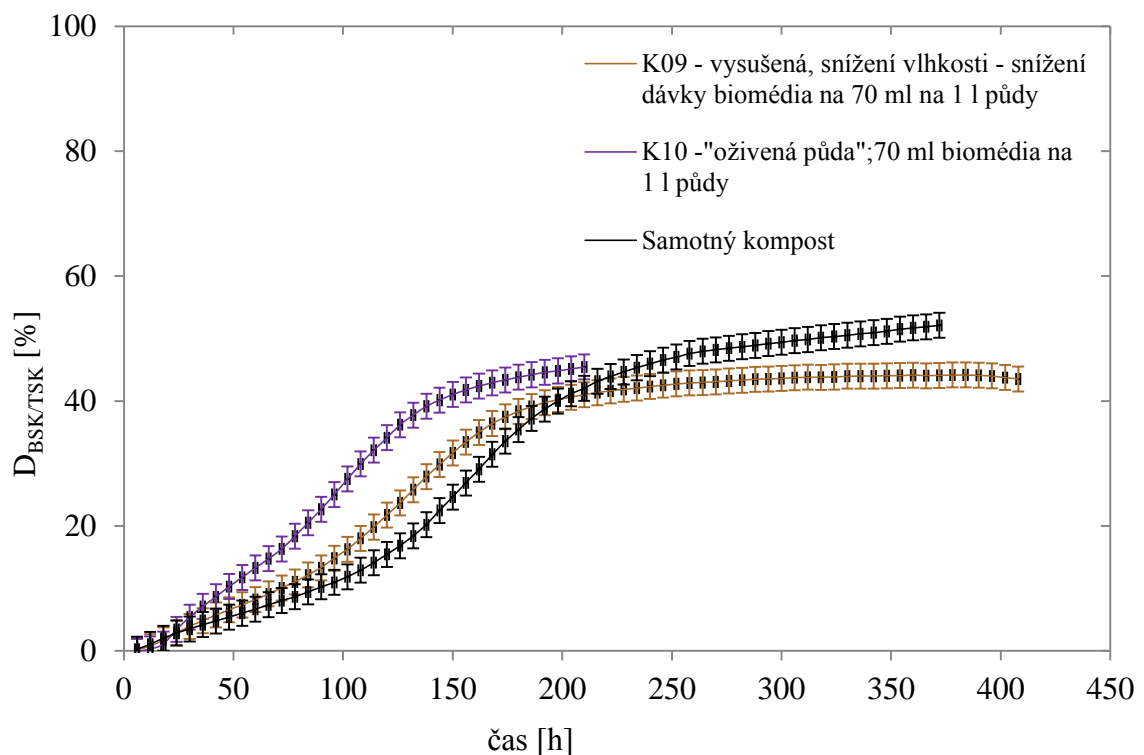
Musela tak být zahájena nová série testů mikrobiální aktivity směsné půdy, nyní již připravované ze zemědělské jílové půdy „podzimní“ odběr a druhého balení komerčního kompostu.



Obrázek 22 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy

Nicméně tento odběr půdy (Obrázek 22; K07) neměl požadovanou vlhkost a i kompost vykazoval o 10 % vyšší relativní vlhkost, takže nemusely být v reakčních nádobách vytvořeny pro rozklad vhodné podmínky. Relativní vlhkost půdy byla v tomto případě téměř 56%. Rozklad glukózy po 72 hodinách byl jen 13 %. Nasazovat velký pokus s rozkladem směsných polymerů tak nepřipadal v úvahu a byla projevena snaha upravit podmínky půdního prostředí, aby se mikrobiální aktivita zvýšila. Jílová půda tedy byla pozvolna sušena na vzduchu za laboratorní teploty (dle ČSN EN ISO 11721-1), než její relativní vlhkost klesla na cca 7 %. Po tomto vysušení půdy byl proveden opět další kon-

trolní pokus (Obrázek 22; K08). Směsná půda připravovaná z druhého „podzimního“ odběru i přesto zdaleka nevykazovala uspokojivou rychlost rozkladu, byť se maximální rychlost rozkladu o setinu zvýšila, biologický rozklad glukózy po třech dnech se dokonce o 4 % snížil. Po rozkladu glukózy v půdním prostředí tohoto experimentu byla do již adaptované půdy (Obrázek 22; K08 – adaptovaná půda), vnesena další dávka glukózy, jejíž rozklad byl velice rychlý. Během tří dnů došlo k 57 % rozkladu. Byla tedy zvažována myšlenka mikrobiální aktivitu podpořit přidavkem snadno rozložitelného substrátu, aby došlo před zahájením velkého pokusu ve směsné půdě k pomnožení mikroorganismů. Neuspokojivý biologický rozklad (Obrázek 22; K08) mohl být zapříčiněn i tím, že relativní vlhkost půdy byla stále vyšší než 50 %, bylo tedy nezbytné změnit postup přípravy směsné půdy, tak aby byla v reakčních nádobách relativní vlhkost 50 %. Dávkování biomédia bylo sníženo zpět na 70 ml biomédia na 1 l půdy, přičemž původní koncentrace minerálních prvků byla zachována.



Obrázek 23 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy; „oživení“ půdy

Ovšem ani po tomto opatření (Obrázek 23; K09) se rychlost rozkladu substrátu nezvýšila, byť vlhkost prostředí již byla uspokojivá. Nový odběr půdy v terénu již nebylo vzhledem k meteorologickým podmínkám (zimní měsíce) možno provést, a proto bylo po konzultaci s odborníkem přistoupeno k oživení mikrobiálních kultur půdy přínosem pod-

půrného snadno využitelného substrátu a dalších stopových prvků během doby její 14 denní aklimatizace. V takto připravené půdě byl již proveden test na rozklad polymerních směsí PVP/PLA PVP/PLA/kosubstrát. Test „oživené“ půdy na rozklad glukózy byl z časových důvodů proveden až na konci diplomové práce (Obrázek 23; K10). Bylo zjištěno, že maximální rychlost rozkladu glukózy se nelišila od předchozích měření, přesto je na křivce biologického rozkladu pro tento experiment vidět zlepšení průběhu biodegradace glukózy, rozklad glukózy po 72 hodinách pokusu se zvýšil na 16 %, takže jistý pozitivní efekt tohoto „oživení“ půdy byl pozorovatelný, což dokazoval i mikrobiologický rozbor půdy (Tabulka 8).

Tabulka 8 Vyhodnocení mikrobiologického rozboru prováděného ze směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy a směsné půdy po „oživení“ mikrobiálních kultur

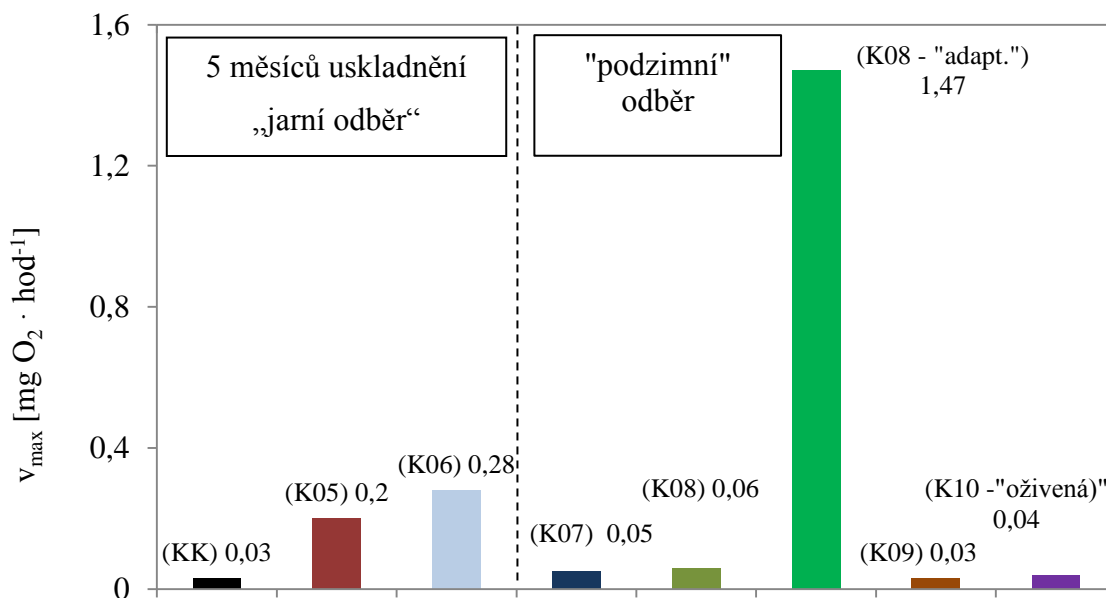
	„podzim“	„oživení“
	[CFU·g <sup>-1</sup> ]	
<b>Chemoorganotrofní aerobní bakterie</b>	$2 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^7$
<b>Aktinomycéty</b>	$2,5 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$
<b>Půdní vláknité plísně</b>	$1,8 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^4$
<i>Azotobacter</i>	0	0

Pozn.: „oživení půdy“ – 0,2 g glukózy, 0,2 g octanu sodného, 0,2 g HYCOLU na 8,5 l půdy

Provedený mikrobiologický rozbor pro směsnou půdu připravenou z „podzimního“ odběru zemědělské půdy, potvrdil, že výskyt chemoorganotrofních bakterií i aktinomycet byl nižší než v případě odběru „jarního“. Počet vláknitých plísni byl v případě „podzimního“ odběru o něco vyšší, zřejmě v důsledku prodloužení doby aklimatizace směsné půdy ze 7 na 14 dní. Přínosem podpůrného substrátu a dalších stopových prvků došlo k výraznému zmnožení mikrobiálních společenstev.

Z průběhu experimentů vyplývá, že dlouhodobé uskladnění půdy, bude ovlivňovat při experimentálním měření rychlost rozkladu studované látky (Tabulka 9, Obrázek 24). Na základě poznatků z experimentů<sup>49</sup> zabývajících se změnou půdních vlastností v průběhu jejího uskladnění, je vhodnější půdu, v případě jejího skladování po dobu do tří měsíců, umístit do chladničky s teplotními podmínkami do 4 °C, dlouhodobější skladování

půdy by pak vyžadovalo její zamrazení při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro skladování a charakterizaci půd určené k laboratorním experimentům neexistují zatím žádné striktní podmínky a požadavky. Půda představuje velice složitý heterogenní systém a jejich dosažení by bylo bez narušení jejího přírodního charakteru prakticky nemožné.



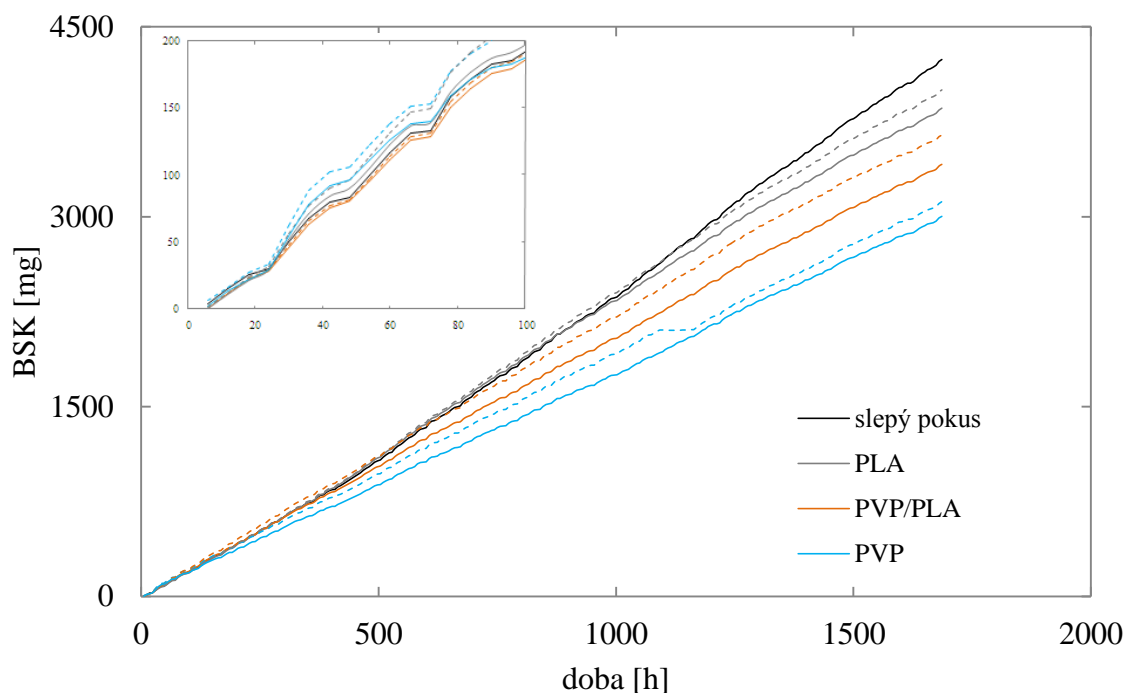
Obrázek 24 Maximální rychlosti rozkladu glukózy odečtené z křivek rychlosti produkce kyslíku pro jednotlivé experimenty (K05–K10)

Tabulka 9 Stanovené parametry z průběhu křivek biologického rozkladu glukózy II

MĚŘENÍ	$t_{\text{rozkl}}$ [h]	$D_{72}$ [%]	$D_{\text{BSK/TSK}}$ [%]	$t_{\text{max}}$ [hod]	$v_{\text{max}}$ [ $\text{mg O}_2 \cdot \text{hod}^{-1}$ ]
KK	204	8	$52 \pm 2$	150	0,03
K05	118	25	$59 \pm 1$	31	0,20
K06	192	35	$70 \pm 6$	35	0,28
K07	186	13	$48 \pm 2$	95	0,05
K08	114	9	$49 \pm 3$	106	0,06
K08 ad.	68	57	$65 \pm 1$	12	1,47
K09	162	10	$44 \pm 2$	130	0,03
K10	92	16	$45 \pm 2$	110	0,04

## 8.2 Vyhodnocení biologické rozložitelnosti směšného polymeru PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát v půdním prostředí

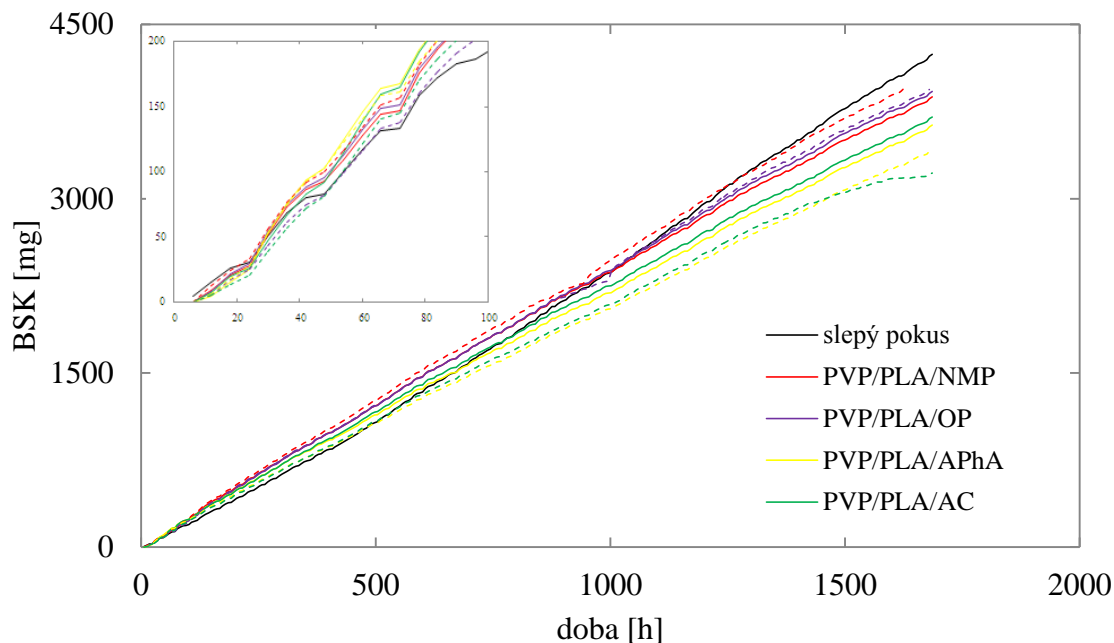
Vzhledem k výsledkům testování mikrobiální aktivity půdy za rozkladu glukózy byla připravená směšná půda pro experiment obohacena o 70 ml biomédia na 1 l půdy. Biomédium obsahovalo navíc  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  glukózy,  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  octanu sodného a  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  HYCOLU (bílkovinný hydrolyzát). Doba aklimatizace byla prodloužena na 14 dní. Biologický rozklad směsí PVP/PLA/kosubstrát, směsí PVP/PLA či fólie čisté PLA nebo fragmentů fólie samotného PVP byl prováděn také na laboratorním respirometru BI 2000. Experiment trval 70 dní. Základními pozorovanými parametry byly opět sušina a  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ , před zahájením a po ukončení měření. Během experimentu nedocházelo k žádným významným změnám sušiny ani  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ .



Obrázek 25 Průběh BSK v čase experimentu; rozklad směšného polymeru PVP/PLA a samotného PVP a PLA

V průběhu prvních 330 hodin testu bylo pro směs PVP/PLA dosaženo takřka 4% biologického rozkladu, avšak po této době docházelo k systematickému poklesu BSK až pod hodnotu slepého pokusu. Tento trend je patrný u všech testovaných směsí. Nejvyšší zaznamenaný rozklad pro fragmenty fólie PVP byl zaznamenán ve 46. hodině, maximální rozklad samotné fólie PLA proběhl do 630 hodin. Na základě těchto informací nemůžeme

určit, zda u směsné fólie PVP/PLA docházelo k rozkladu PVP nebo PLA, k identifikaci by bylo nutné provést řadu dalších testů.



Obrázek 26 Průběh BSK v čase experimentu; rozklad směsného polymeru PVP/PLA/kosubstrát

Testy biologického rozkladu fólií s přidavkem kosubstrátu (Obrázek 26) zaznamenaly nejvyšší míru degradace v případě fólie PVP/PLA/NMP a to 15 %, pro směsnou fólii PVP/PLA/OP byl zaznamenán rozklad o 5 % nižší než u PVP/PLA/NMP. Nejnižší míra degradace 6 % byla zaznamenána u fólie PVP/PLA/ApHA, u PVP/PLA/AC byl rozklad pouze o jedno procento vyšší než v případě PVP/PLA/ApHA. U všech měření byl zaznamenán trend popsáný už pro obrázek 25, a to, že po určité době biologického rozkladu fólie dochází k poklesu BSK pod úroveň slepého pokusu, po 1250 hodinách měření se pod úroveň slepého pokusu pohybovaly BSK pro všechny polymerní směsi (Obrázek 26).



Tabulka 10 Vyhodnocení % degradace polymerních směsí PVP/PLA a směsí PVP/PLA/kosubstrát

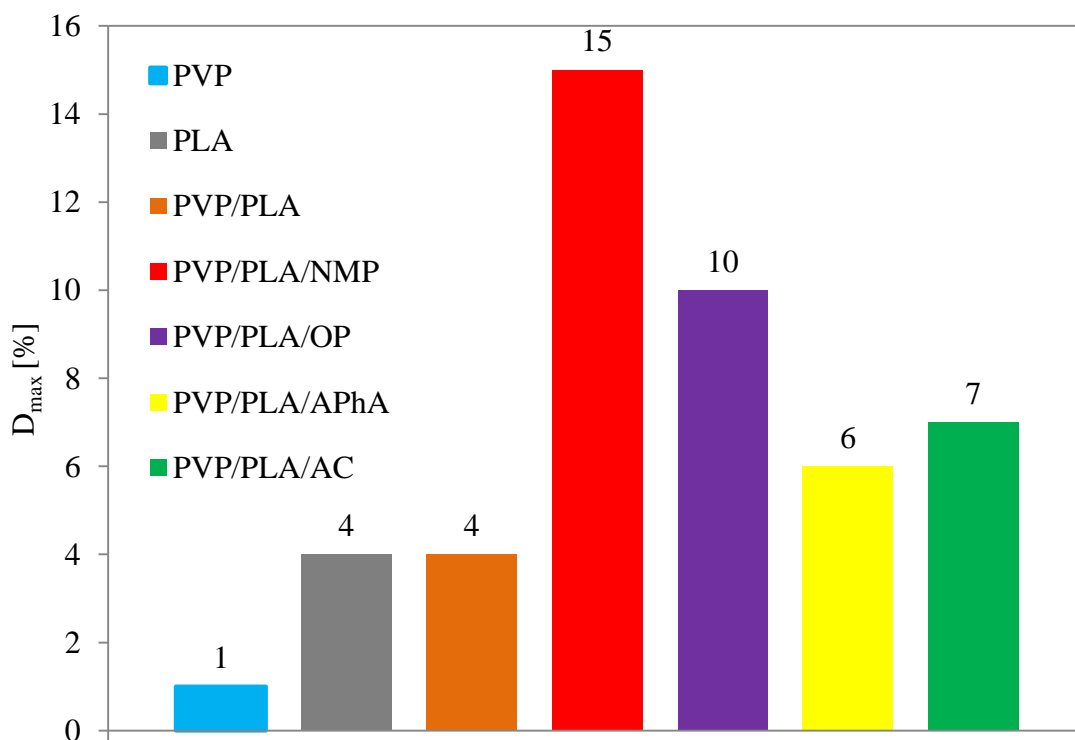
	$CHSK_{Cr}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	$BSK_{max}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	$D_{max}$ [%]	$t_{max}$ [hod]	$m_{\text{úbytek}}$ [%]
PVP	1730	22	1	42	-
PLA	1007	44	4	630	0
PVP/PLA	1337	48	4	330	40
PVP/PLA/NMP	1240	181	15	468	46
PVP/PLA/OP	1388	140	10	408	42
PVP/PLA/APhA	1227	79	6	312	48
PVP/PLA/AC	1214	87	7	402	48

Kde:

$D_{max}$  je maximální rozklad fólie v půdním prostředí v čase  $t_{max}$  [%]

$CHSK_{Cr}$  je chemická spotřeba kyslíku pro úplnou oxidaci substrátu [ $mg \cdot g^{-1}$ ]


$BSK_{max}$  je maximální dosažená biologická spotřeba kyslíku při rozkladu [ $mg \cdot g^{-1}$ ]



Obrázek 27 Vyhodnocení % degradace směsí PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát

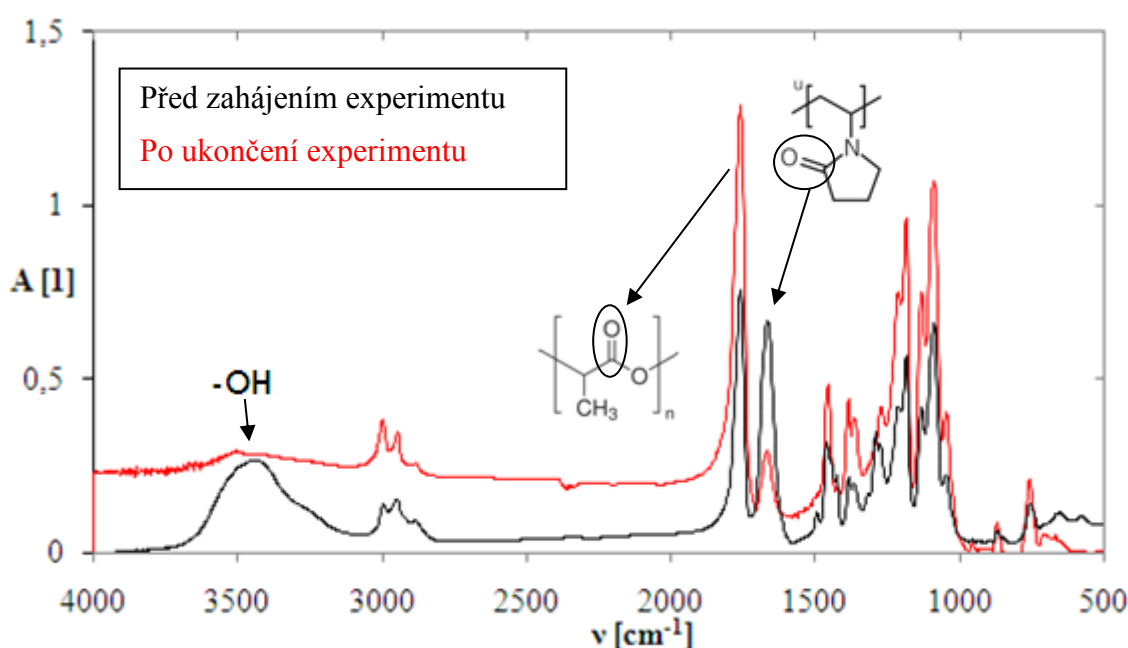
Z výsledků (Tabulka 10, Obrázek 27) je zřejmé, že při zaznamenání vyšší míry degradace docházelo jen k rozkladu kosubstrátů. Vyhodnocení biodegradace fólií bylo prováděno dle vztahu (1).  $CHSK_{Cr}$  bylo stanoveno pro fólie teoretickým výpočtem na základě navážek a experimentálně stanoveného  $CHSK_{Cr}$  pro jednotlivé komponenty, z nichž byly fólie připraveny. Uvedené hodnoty degradace v tabulce 10 jsou také maximální dosažené. Hmotnostní úbytek fólií kolem 45 % opět značí uvolnění podílu PVP z matrice. Na obrázku 27 jsou shrnuty výsledky míry degradace všech pozorovaných vzorků fólií. Nejvyšší rozklad byl zaznamenán v případě vzorku fólie PVP/PLA/NMP, vůbec nejnižší rozklad probíhal u vzorku samotné fólie PVP.

Na snímcích fólií před zahájením a po ukončení experimentu, jsou vizuálně pozorovatelné rozdíly. Fólie ztrácí původní žlutý nádech způsobený přítomností PVP. Při experimentu fólie ztratily také původní lesk a výrazně zkřehly. Změřena byla také pomocí FTIR spektrofotometru IČ spektra před zahájením a po ukončení biologického rozkladu fólií v půdním prostředí.

	<b>PŘED</b>	<b>PO</b>
<b>PVP/PLA</b>		
<b>PVP/PLA/OP</b>		
<b>PVP/PLA/NMP</b>		
<b>PVP/PLA/APhA</b>		
<b>PVP/PLA/AC</b>		

Obrázek 28 Snímky povrchu fólií před zahájením experimentu a po jeho ukončení

Vzhledem k tomu, že hodnoty  $D_{\text{BSK/CHSK}}$  jsou v některých případech vyšší a neodpovídají pouze rozkladu kosubstrátu, byly vzorky podrobeny FTIR analýze. Zaměříme-li se na IČ spektrum (Obrázek 29) podrobněji, můžeme na něm vidět charakteristické funkční skupiny jak pro PLA, tak pro PVP. Na vlnočtu  $1760\text{ cm}^{-1}$  se nachází pík C=O vazby ze struktury PLA, dalším je pík o vlnočtu  $1454\text{ cm}^{-1}$ , který dokazuje přítomnost  $-\text{CH}_3$ , a pík na vlnočtu  $1274\text{ cm}^{-1}$  je charakteristický pro její vazbu  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ . Co se týče píků charakteristických pro přítomnost PVP, můžeme zmínit mimo široký pás  $-\text{OH}$  skupiny na vlnočtu nad  $3000\text{ cm}^{-1}$ , pík na vlnočtu  $1666\text{ cm}^{-1}$  vazby C=O jako součást laktamového kruhu PVP či vazbu C–N při  $1289\text{ cm}^{-1}$ .



Obrázek 29 FTIR spektrum směsné fólie PVP/PLA

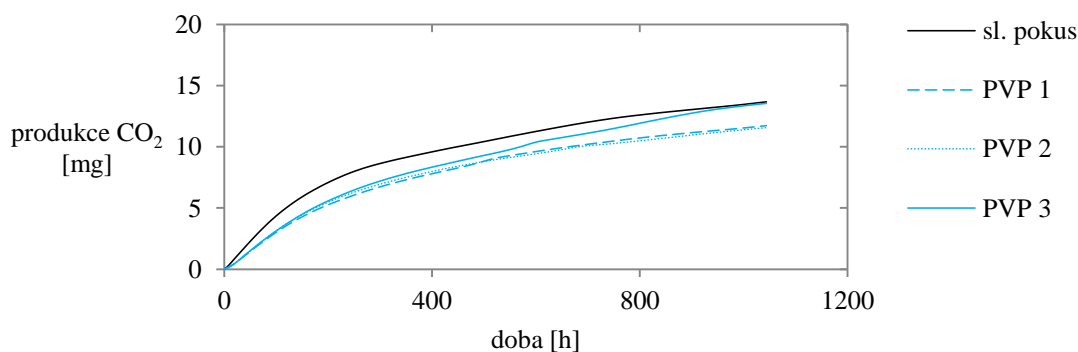
Naměřená IČ spektra víceméně potvrzují, že bylo PVP během experimentů ze struktury fólie skutečně odstraněno. Vzhledem k tomu, že se spektra folií s přídavkem kosubstrátů od sebe nijak výrazně nelišila, byl do diplomové práce pro názornost zařazen jako reprezentant vzorek PVP/PLA. Na IČ spektru fólie, po jejím podrobení experimentu v půdním prostředí (Obrázek 29), bylo zaznamenáno několik změn a to především v oblasti vlnočtů charakteristických pro PVP. Došlo ke snížení píků na vlnočtu kolem  $3000\text{ cm}^{-1}$ , tedy píku charakterizujícím  $-\text{OH}$  skupinu, snížily se také hodnoty absorbance pro pík vazby C=O laktamového kruhu PVP na vlnočtu  $1666\text{ cm}^{-1}$  i pík pro vazbu C–N, na vlnočtu  $1286\text{ cm}^{-1}$ . IČ spektra folií s přídavkem kosubstrátů jsou uvedena v příloze 1.

### 8.3 Vyhodnocení biologické rozložitelnosti směsného polymeru

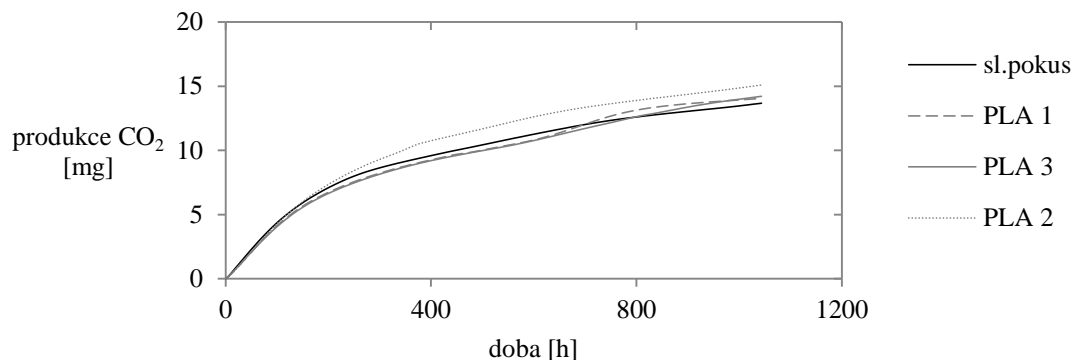
#### PVP/PLA ve vodném prostředí s inokulem z AK ČOV Malenovice

Bylo provedeno měření biologického rozkladu polymerních směsí PVP/PLA (50/50) a PVP/PLA/NMP ve vodném prostředí zaočkovaném inokulem z aerobního aktivovaného kalu z ČOV Malenovice na respirometru Micro-Oxymax. Testována na biologickou rozložitelnost také byla fólie ze samotné PLA a fragmenty fólie ze samotného PVP. Průběh produkce oxidu uhličitého vznikajícího při rozkladu substrátu pro jednotlivá měření je uveden na obrázcích 30–33. Experiment probíhal po dobu 45 dní.

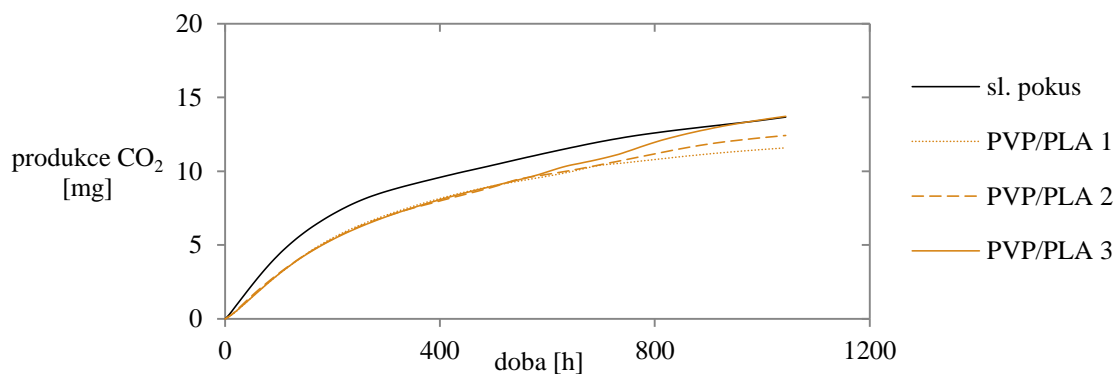
Vyhodnocení míry degradace zvolených vzorků na přístroji Micro-Oxymax bylo prováděno dle vztahu (3) uvedeném v kapitole 5.5. Mimo jiné byla pozorována také koncentrace rozpuštěného organického uhlíku, jejíž míra značila, že dochází k rozpuštění podílu PVP z fólií, tuto domněnku víceméně potvrzoval i 50% hmotnostní úbytek vzorků. Významný hmotnostní úbytek, byl pozorován i v případě de Pauly. Stanovení organického uhlíku a zaznamenané hodnoty produkce CO<sub>2</sub> vylučují, že by mohlo v našem případě docházet k takové míře biologického rozkladu. V případě de Pauly byl hmotnostní úbytek vyšší, stejně jako hodnoty produkovaného CO<sub>2</sub>, což hovoří o reálné biologické degradaci této polymerní směsi. V našem experimentu ovšem potvrzena nebyla.



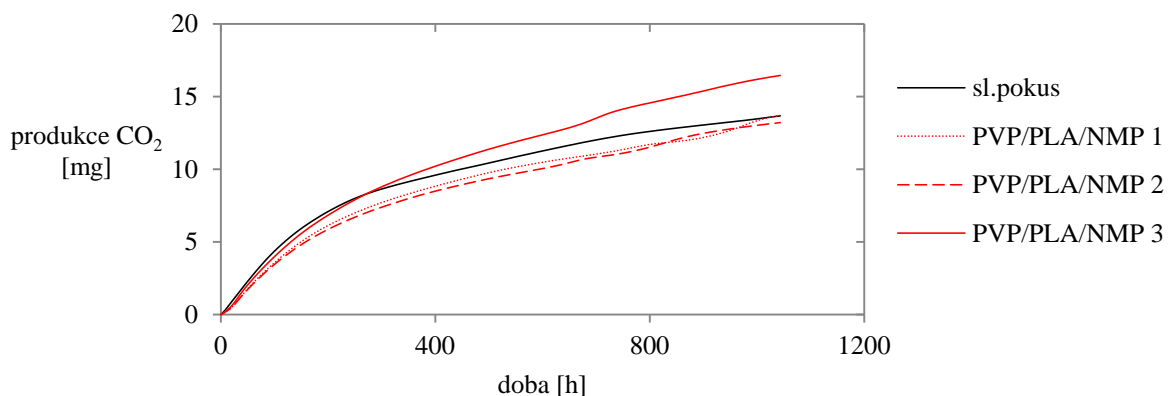
Obrázek 30 Produkce CO<sub>2</sub> při měření rozkladu vzorku PVP ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu



Obrázek 31 Produkce CO<sub>2</sub> při měření rozkladu vzorku PLA ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu



Obrázek 32 Produkce CO<sub>2</sub> při měření rozkladu polymerní směsi PVP/PLA (50/50) ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu



Obrázek 33 Produkce CO<sub>2</sub> při měření rozkladu polymerní směsi PVP/PLA/NMP ve vodném prostředí s inokulem z AK

Ve většině případů docházelo k produkci oxidu uhličitého srovnatelné se slepým pokusem. Jedinou výjimku tvořil pokus č. 3 u měření rozkladu polymerní směsi s 1% (v/v) přídavkem NMP. Rozklad na této pozici byl vyhodnocen jako 12 %. Lze zde tedy předpokládat, že docházelo k rozkladu samotného NMP. Že došlo k rozkladu aditiva z fólie jen

v jednom ze tří případů, způsobila zřejmě nehomogenita fólií. Zajímavým by se mohl zdát také průběh při rozkladu PLA, je u něj pozorovatelný nárůst produkce CO<sub>2</sub> a zaznamenána degradace téměř 19 %, hmotnostní úbytek fólie byl stanoven jako 8,5 %. Můžeme tedy předpokládat, že vlivem dostatečné hydrolyzy dochází k pozvolnému rozkladu PLA. Vliv na rozklad může mít i postup přípravy fólie, tedy použití chloroformu. Použití chloroformu pro přípravu těchto polymerních fólií, v případě, že dojde k jeho vytěkání z polymerní matrice, by mohlo mít vliv na jejich strukturu, což by teoreticky mohlo podpořit rozklad polymerů. Ovšem při nedostatečném odvětrání fólie může mít chloroform díky své vysoké toxicitě inhibiční účinky na mikrobiální aktivitu. Můžeme předpokládat, že v publikaci de Pauly opravdu mohlo docházet k biologickému rozkladu, ovšem pravděpodobnější se jeví biologický rozklad PLA nikoli PVP.

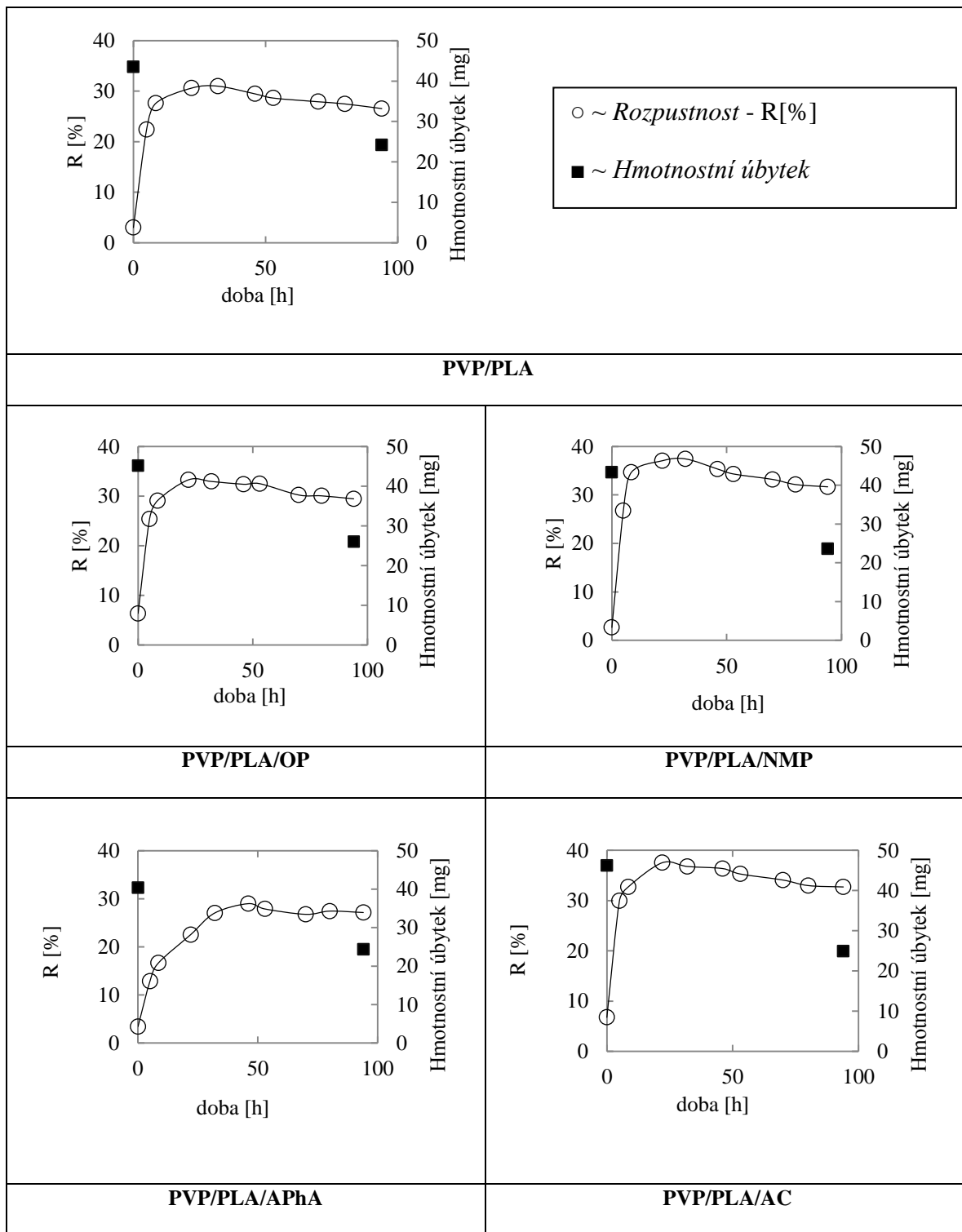
Ani v případě tohoto experimentu nedocházelo k významným změnám pH. Sušina na všech pozicích byla po ukončení pokusu nižší z důvodu absence vhodného substrátu pro růst biomasy. Během pokusu však došlo k již zmiňovanému významnému hmotnostnímu úbytku fólií (52 %), který byl s velkou pravděpodobností způsoben uvolněním PVP z fólie, pro potvrzení této domněnky byl proveden samostatný test rozpustnosti fólií a další testy, které nám přiblížili vlastnosti těchto polymerních směsí.

#### **8.4 Studie vlastností polymerních směsí PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát**

S vyrobenými fóliemi z polymerních směsí PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát nebyly prováděny testy pouze na biologickou rozložitelnost. Pro lepší pochopení jejich vlastností a předpoklad jejich osudu v životním prostředí, byly provedeny následující testy: test rozpustnosti, či nasákavosti. Byly pořízeny snímky povrchu fólií pomocí SEM, a byla provedena i jejich spektrální analýza za pomoci FTIR (Příloha 1).

##### **Rozpustnost**

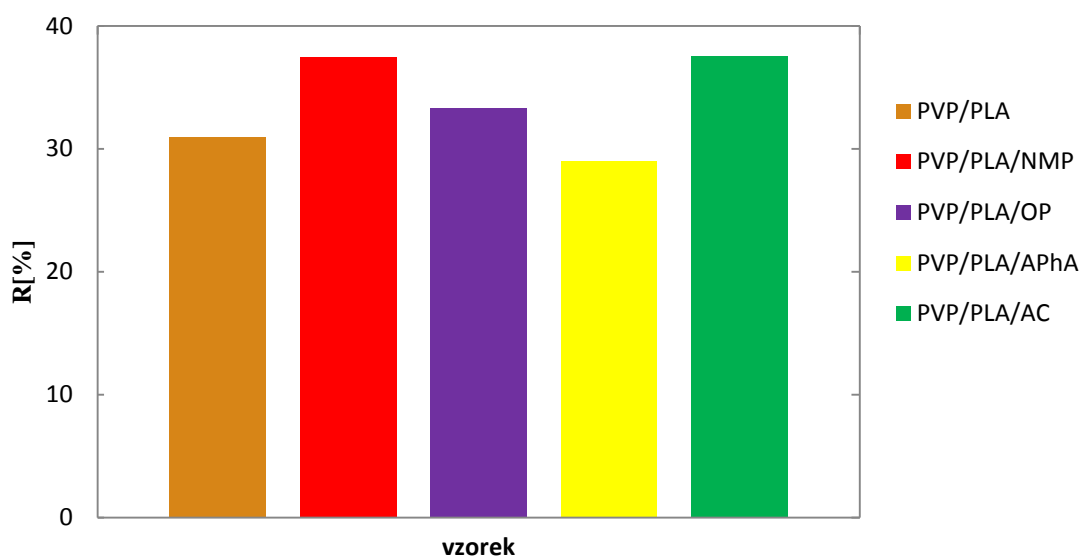
Test rozpustnosti fólií nám potvrdil domněnku o uvolnění podílu PVP. Tento fakt způsobil zřejmě i popisovanou významnou degradaci fólií v publikaci de Pauly hodnocenou na základě změn hmotnosti. Nicméně provádět gravimetrické testy pro zhodnocení biologického rozkladu fólií pro ve vodě rozpustné polymery je bezpředmětné. Křivky rozpustnosti pro jednotlivé fólie znázorňuje obrázek 34. Na obrázku 35 jsou shrnuté výsledky testů rozpustnosti pro jednotlivé vzorky fólií.



Obrázek 34 Průběh rozpustnosti dle DOC jednotlivých druhů fólií v čase ve srovnání s hmotnostním úbytkem po 96 hodinách



Při testu rozpustnosti fólie PVP/PLA bez přídavku kosubstrátů byl pozorován úbytek uhlíku přes 30 % jeho původního obsahu. Opět docházelo k 50% ztrátě hmotnosti fólie, která byla potvrzena gravimetricky. K zásadnímu úbytku hmotnosti fólií došlo po 22 hodinách, v případě de Pauly docházelo k hmotnostnímu úbytku pomaleji, 50% hmotnostní úbytek fólie zaznamenali až po 6 týden experimentu. Fólie byly v případě de Pauly připravovány z PVP o molekulové hmotnosti  $25\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , a je známo, že rozpustnost PVP s vyšší molekulovou hmotností klesá<sup>25</sup>, dalším vysvětlením tohoto průběhu by mohly být odchylky při postupu výroby polymerních směsí, například odlišná tloušťka fólií, kterou de Paula ve své publikaci nezmiňuje. U vzorku s přídavkem APhA byla rozpustnost nižší a k úbytku hmotnosti docházelo na rozdíl od ostatních fólií velmi pomalu, k ustálení rozpustnosti v jeho případě došlo až po 46 hodinách. U fólií s přídavkem OP, NMP a AC byl zaznamenán vyšší úbytek hmotnosti, způsobený rozpouštěním právě těchto aditiv, neboť se jedná ve všech případech o ve vodě rozpustné látky. Experiment byl prováděn do ustálení rovnovážného stavu tj. po dobu 4 dnů.

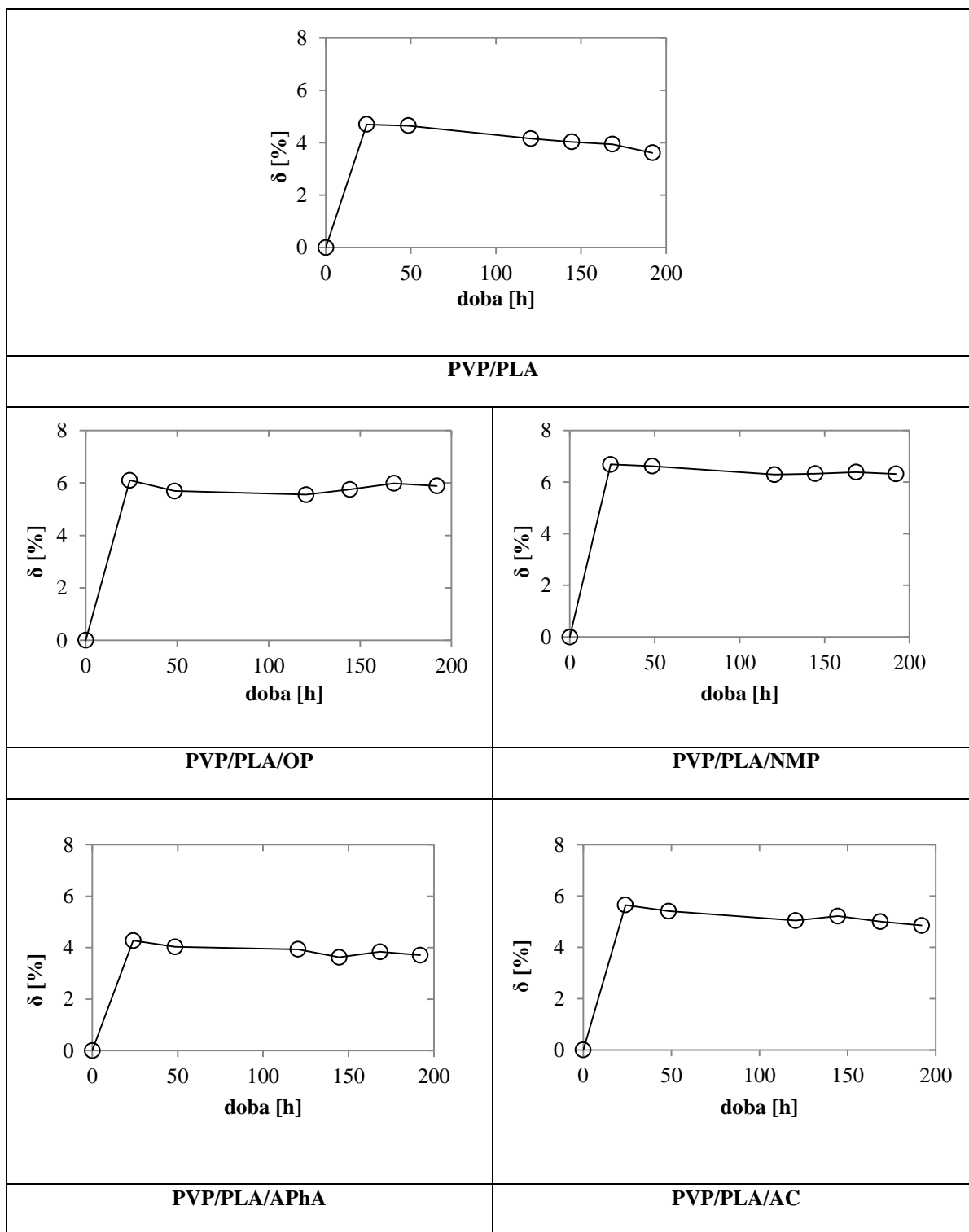


Obrázek 35 Rozpustnost směsného polymeru PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát dle DOC

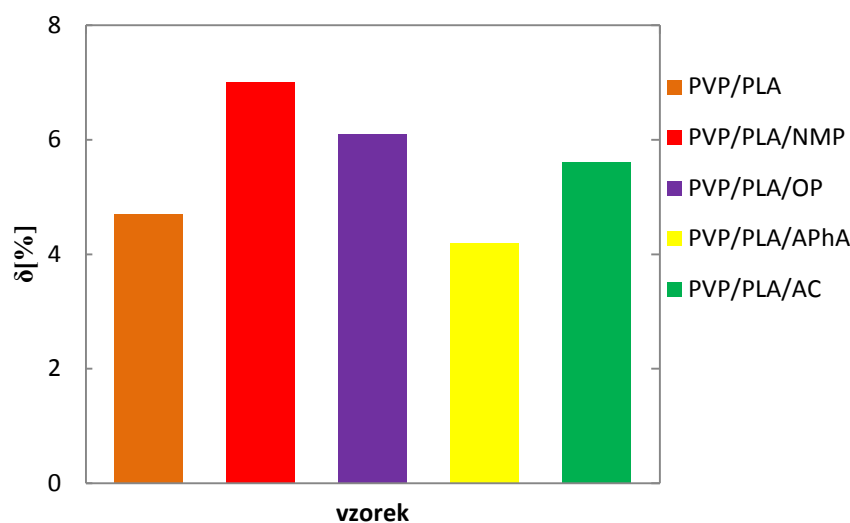
### Nasákavost

Test nasákavosti ( $\delta$  [%]) fólií PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát byl proveden pro odhadnutí jejich chování v půdním prostředí, kde se relativní vlhkost během experimentů pohybovala mezi 50–54 %. Test byl prováděn v exsikátoru s 54% vlhkostí. Fólie s přídavkem NMP, OP a AC jsou více hygroskopické než směsi PVP/PLA a PVP/PLA/APhA. Z časového průběhu jednotlivých měření (Obrázek 36) pro dané fólie je

vidět že k nárůstu vlhkosti došlo již po prvních 24 hodinách. Experiment byl prováděn po dobu 192 hodin (8 dní). Shrnutí výsledků tohoto testu je uvedeno na obrázku 37, nasákavost fólie samotné PVP/PLA byla kolem 5 %, v případě fólie s přídavkem APhA, byla stanovena 4% nasákavost.



Obrázek 36 Průběh nasákavosti  $\delta$  [%] jednotlivých fólií v čase

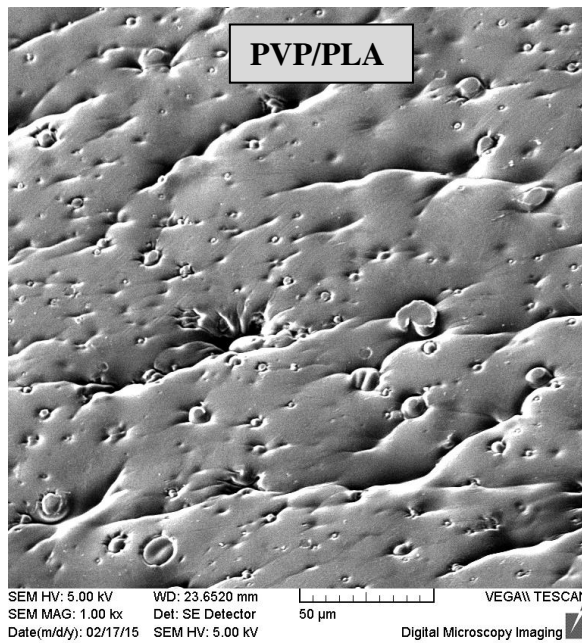
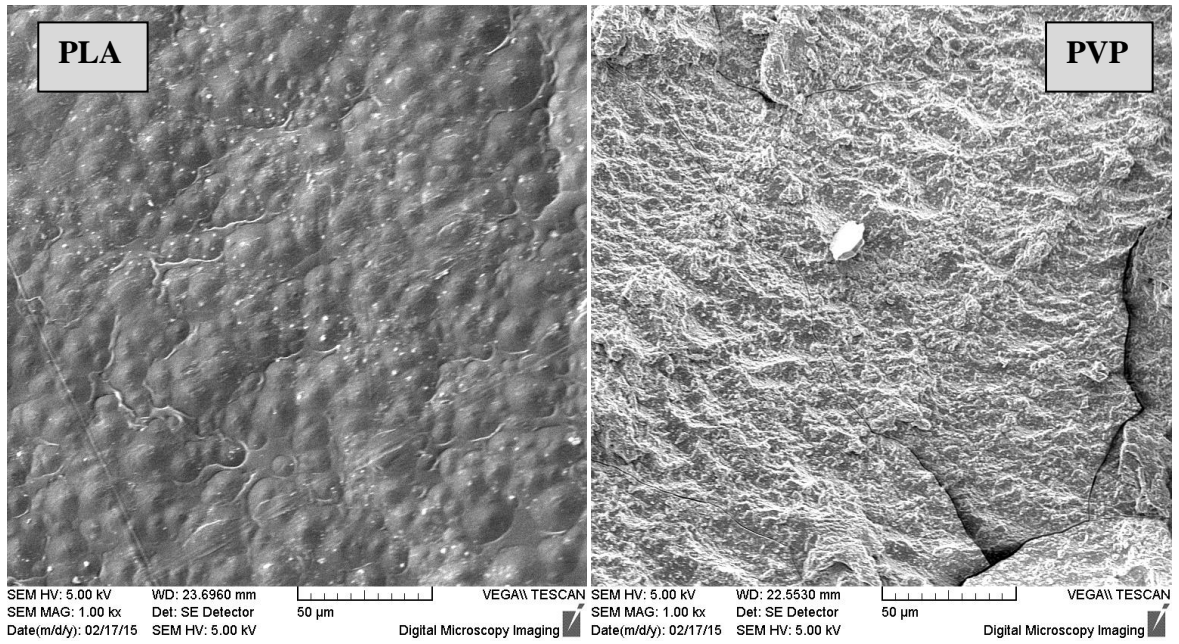


Obrázek 37 Shrnutí výsledků testu nasákavosti jednotlivých fólií

### Skenovací elektronová mikroskopie

Na základě některých výsledků práce a optického zhodnocení kvality fólií (Obrázek 28) bylo uvažováno o možné nehomogenitě připravených polymerních směsí, a proto byly pořízeny snímky povrchu fólií pomocí SEM. Na obrázku 38 je uveden snímek povrchu fólie připravené ze směsného polymeru PVP/PLA a snímky povrchu fólií připravených pouze z PLA a pouze z PVP. Snímek směsné fólie PVP/PLA potvrdil, že značná část matrice fólie je tvořena z PLA a v ní se nachází heterogenní oblasti s PVP. Tyto snímky poukazují na vzájemnou nemísitelnost polymerů, což je tedy důvodem značné nehomogenity fólií, v jejímž důsledku mohlo docházet k většímu rozptylu naměřených dat. Pořízené snímky SEM pro zbývající fólie s přidavkem kosubstrátů jsou uvedeny v příloze 2.

Snímky povrchu fólií, jež byly podrobeny po dobu 70 dní experimentu v půdním prostředí, již nebylo možno z technických a časových důvodů realizovat.



Obrázek 38 SEM snímky povrchu fólií

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověřit biologickou rozložitelnost neupraveného vzorku polymeru PVP K15 v půdním prostředí, pozorovat vliv adaptace prostředí na zvolené kosubstráty, při snaze podpořit biologický rozklad PVP K15 a v neposlední řadě ověřit výsledky biologické degradace polymerní směsi PVP/PLA (50/50) naměřené de Paulou<sup>39</sup>.

Půdní prostředí bylo simulováno směsnými půdami připravovanými ze zemědělské jílové půdy a komerčního zahradnického kompostu smíchanými v poměru 1:5. V průběhu celé diplomové práce byly prováděny kontrolní experimenty zjišťující aktuální mikrobiální aktivitu připravené směsné půdy. Bylo zjištěno, že mikrobiální aktivita se v průběhu uskladnění snižuje, dosavadní uskladňování půdy se nejeví jako nejvhodnější, a proto bylo navrženo uchovávat půdu při teplotě do 4 °C, případně ji zamrazit.

Experimenty zabývající se biologickým rozkladem neupraveného vzorku PVP K15 nepřinesly nové informace, potvrzeno však bylo zjištění z diplomové práce Vyoralové<sup>25</sup> a to maximální rozklad PVP K15 3 % (162 hodin).

Podpoření biologického rozkladu PVP K15 adaptací půdního prostředí na zvolené kosubstráty nebylo příliš úspěšné, k rozkladu PVP K15 docházelo pouze v prostředí adaptovaném na akrylamid, v něm docházelo k maximálnímu rozkladu PVP K15 7 % (66 hodin), vzhledem k zjištění z práce Vaškové<sup>7</sup>, která zaznamenala rozklad PVP K15 v přítomnosti akrylamidu 21 %, by mohla být možnost vlivu enzymatického vybavení mikrobiálních kultur vznikajícího při rozkladu akrylamidu reálná. Dosažené výsledky je zapotřebí ještě ověřit.

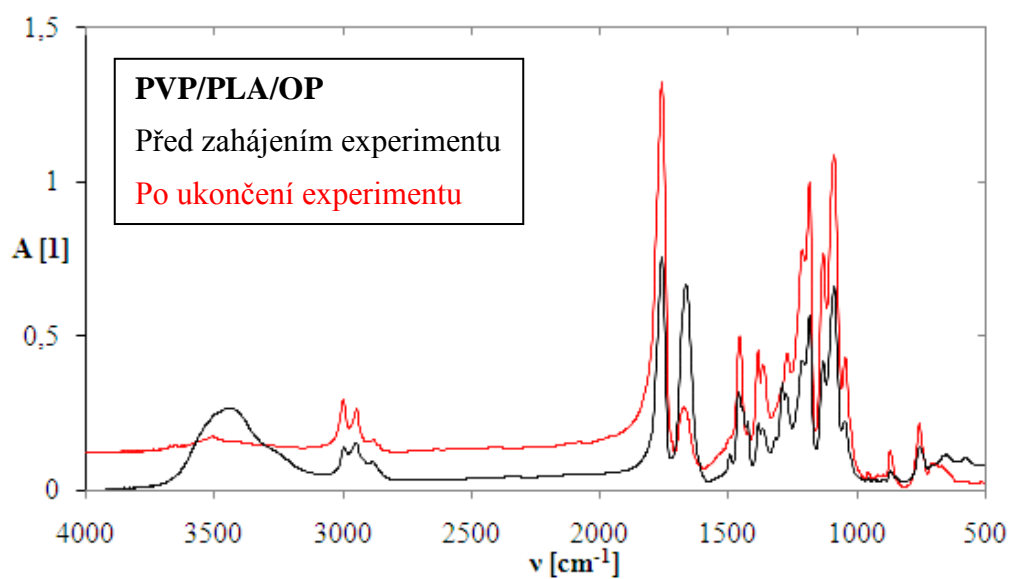
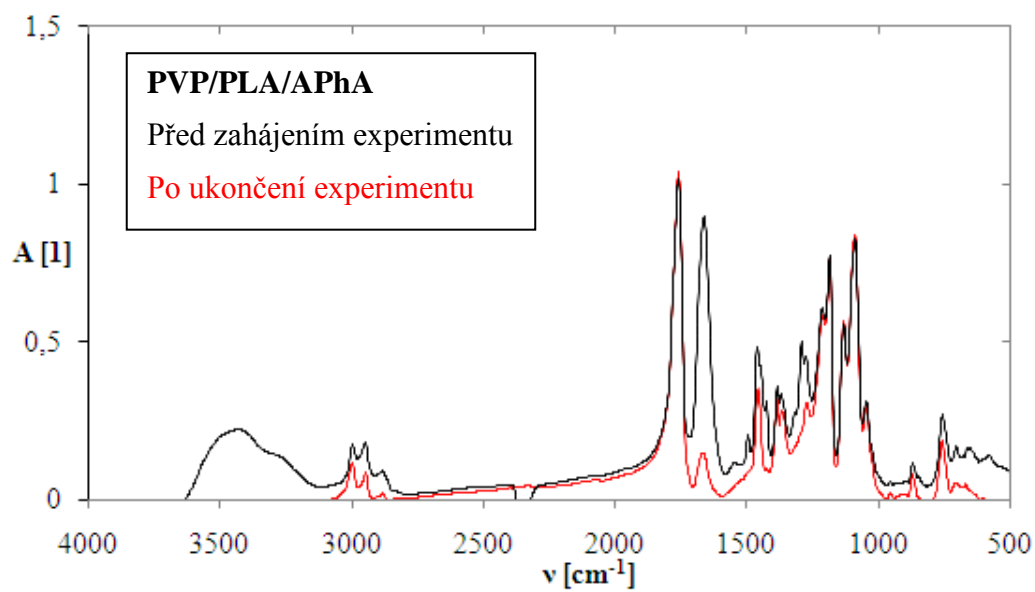
Poslední experiment byl zaměřený na studii biologického rozkladu polymerních směsí PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát. Byl zaznamenán mírný biologický rozklad těchto vzorků, nicméně ten odpovídal rozkladu kosubstrátu. Fólie vyrobené z této polymerní směsi podléhají ve výrazné míře degradaci, ovšem nikoli biologické, dochází k uvolnění podílu PVP, jelikož mezi nemísitelnými složkami PVP a PLA nejsou žádné silné interakce. Nicméně tento proces by mohl podpořit biologický rozklad PLA, neboť po uvolnění PVP v matrici PLA zůstávají póry, a tak se stává PLA pro mikrobiální kultury přístupnější. To je pravděpodobně důvodem zvýšené produkce CO<sub>2</sub> v práci de Pauly<sup>39</sup>. Biologickému rozkladu polymerních směsí PVP by mělo být věnováno více pozornosti, existuje mnoho studií zabývajících se jejich přípravou, ale jejich biodegradaci se už nevěnují.

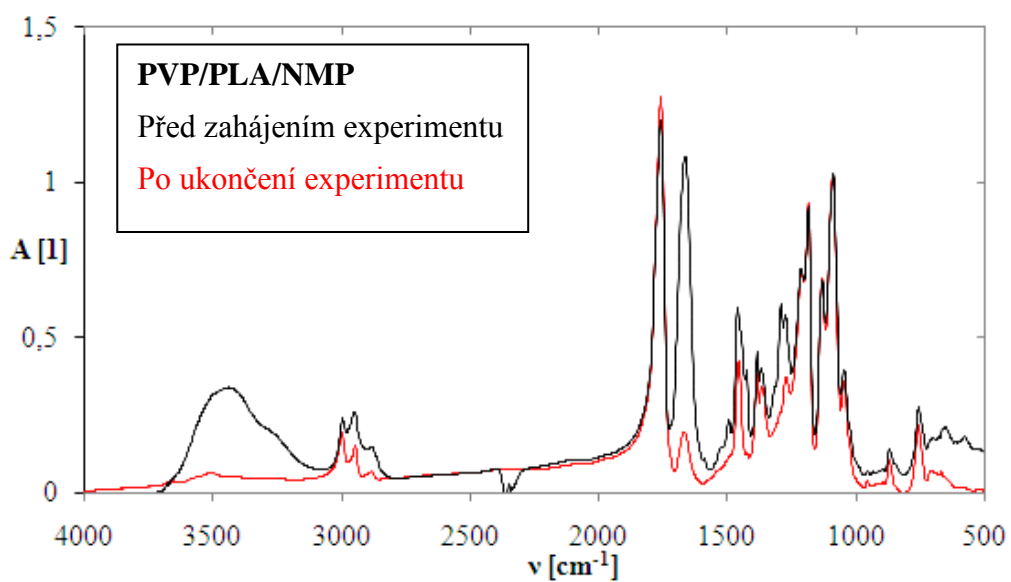
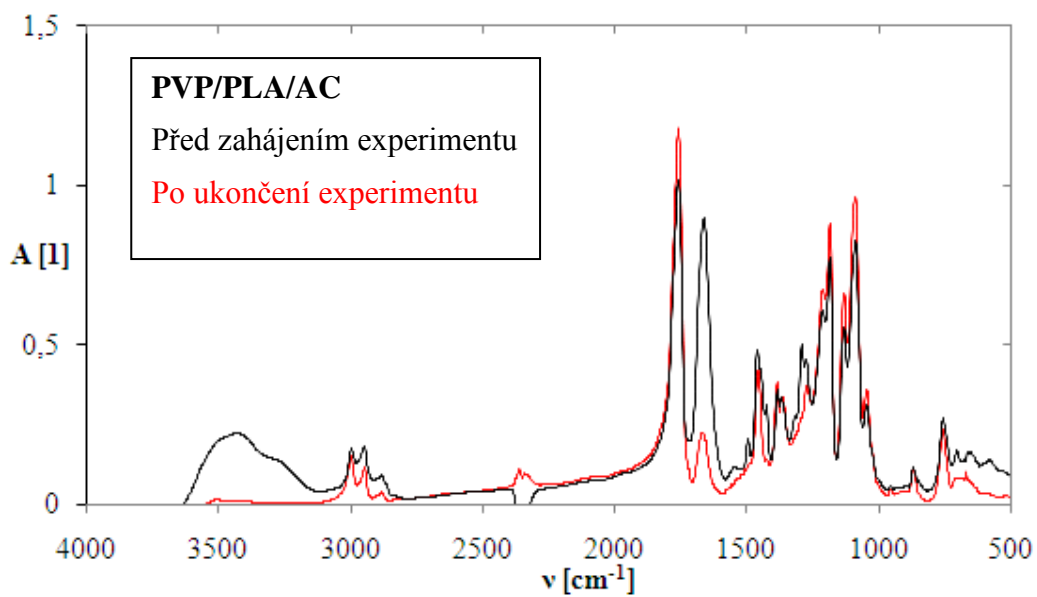
**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AC	akrylamid
AK	aktivovaný kal
APhA	acetylfenylalanin
BSK, BOD	biologická spotřeba kyslíku
CAS	jednoznačný numerický identifikátor pro chemické látky
ČOV	čistírna odpadních vod
D	procento biologického rozkladu
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC/TCD	plynová chromatografie s tepelně-vodivostním detektorem
GPC	gelová permeační chromatografie
LD <sub>50</sub>	letální dávka
LC <sub>50</sub>	Letální koncentrace
M <sub>w</sub>	molární hmotnost
NMP	methylpyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
OP	oktylpyrrolidon
ρ	hustota
PVP	polyvinylpyrrolidon
PLA	kyselina polymléčná
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
T <sub>g</sub>	teplota skelného přechodu
T <sub>m</sub>	teplota tání
TSK	teoretická spotřeba kyslíku

## PŘÍLOHY

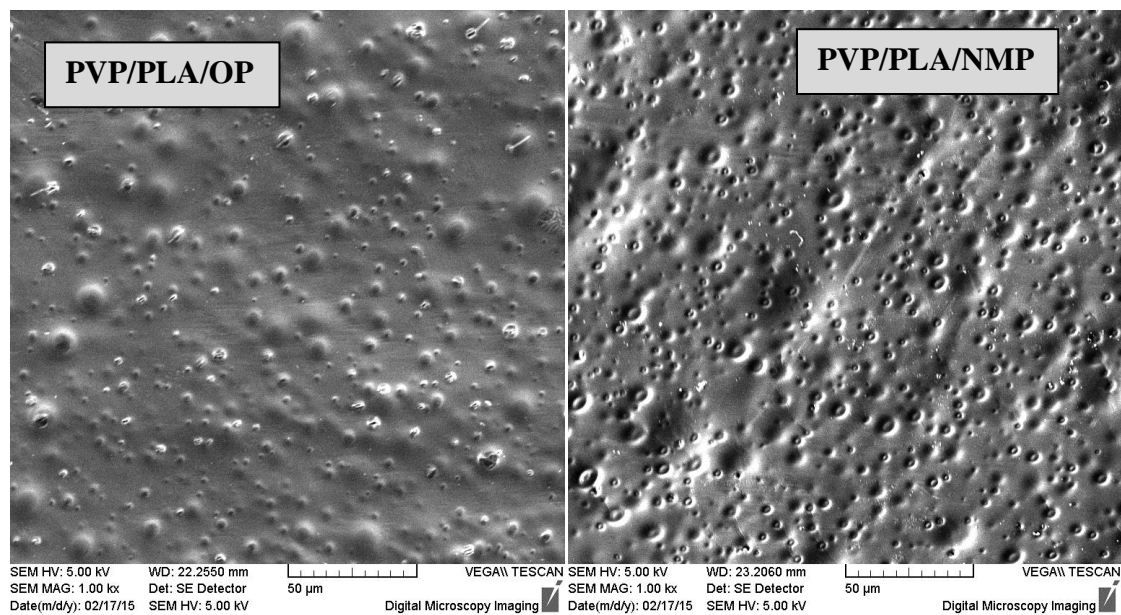
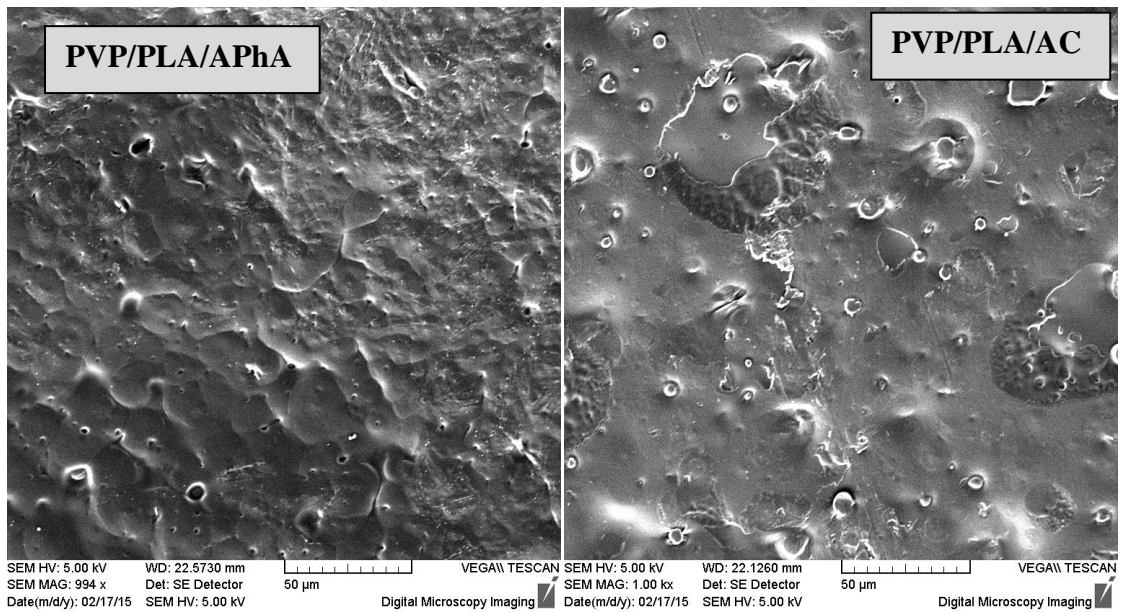
## Příloha 1 IČ spektra fólií s přidavkem kosubstrátu – FTIR







Příloha 2 Snímky povrchu fólií s přídavkem kosubstrátu - SEM



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Obecný strukturní vzorec PVP .....	12
Obrázek 2	Skladba reakční nádoby k respirometru <sup>21</sup> .....	19
Obrázek 3	Skladba elektrolytické cely k respirometru <sup>21</sup> .....	19
Obrázek 4	Předpokládaný průběh biologického rozkladu PVP; a) působení gama-laktamáz; b) působení aminooxidáz <sup>4</sup> .....	20
Obrázek 5	Průběh BSK u neupravených vzorků v aerobním prostředí kalu z ČOV Malenovice (Marušincová) <sup>9</sup> .....	22
Obrázek 6	Průběh BSK při aerobním rozkladu PVP ve vodném prostředí s inokulem zaktivovaného kalu z průmyslové ČOV AK Sl. L'upča (Červenáková) <sup>22</sup> .....	23
Obrázek 7	Biodegradace PVP v prostředí mořské vody (Eubeler) <sup>26</sup> .....	26
Obrázek 8	Vliv akrylamidu na rozklad PVP (Vašková) <sup>7</sup> .....	28
Obrázek 9	Rozklad PVP v písčité půdě (vlevo) a v jílové půdě (vpravo) (Ghanem) <sup>31</sup> .....	30
Obrázek 10	Biodegradace PVP/CMC (20:80) (Roy) <sup>32</sup> .....	30
Obrázek 11	Biodegradace PLA, PLA/škrob (Okhita) <sup>38</sup> .....	31
Obrázek 12	Rozklad směsi PVP/PDLLA (50:50) (Paula) <sup>39</sup> .....	32
Obrázek 13	Produkce CO <sub>2</sub> při rozkladu PVP/PLA fólie (50/50) (Paula) <sup>39</sup> .....	33
Obrázek 14	Kalibrační přímka s intervalem spolehlivosti pro stanovení CHSK <sub>Cr</sub> v rozsahu 0–600 mg·l <sup>-1</sup> .....	43
Obrázek 15	Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „jarního“ odběru zemědělské půdy .....	49
Obrázek 16	Maximální rychlosti rozkladu glukózy pro experimenty K01–K04; aklimatizace půdy 7 dní pro všechna měření .....	51
Obrázek 17	Naměřené BSK v průběhu studia biologického rozkladu PVP .....	52
Obrázek 18	Naměřená BSK v průběhu studia biologického rozkladu PLA .....	53
Obrázek 19	Naměřená BSK v průběhu studia experimentu při rozkladu PVP v adaptovaném půdním prostředí na jednotlivé kosubstráty .....	55
Obrázek 20	Průměrný průběh BSK korigovaný o slepý pokus a vztažený na navážku vzorku; tj, BSK <sub>spec</sub> v čase .....	56
Obrázek 21	Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „jarního“ odběru zemědělské půdy po 5 měsících uskladnění .....	57

Obrázek 22 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy .....	58
Obrázek 23 Průběh biologického rozkladu glukózy při testování mikrobiální aktivity směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy; „oživení“ půdy.....	59
Obrázek 24 Maximální rychlosti rozkladu glukózy odečtené z křivek rychlosti produkce kyslíku pro jednotlivé experimenty (K05–K10).....	61
Obrázek 25 Průběh BSK v čase experimentu; rozklad směsného polymeru PVP/PLA a samotného PVP a PLA .....	62
Obrázek 26 Průběh BSK v čase experimentu; rozklad směsného polymeru PVP/PLA/kosubstrát .....	63
Obrázek 27 Vyhodnocení % degradace směsí PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát .....	64
Obrázek 28 Snímky povrchu fólií před zahájením experimentu a po jeho ukončení.....	66
Obrázek 29 FTIR spektrum směsné fólie PVP/PLA .....	67
Obrázek 30 Produkce CO <sub>2</sub> při měření rozkladu vzorku PVP ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu .....	68
Obrázek 31 Produkce CO <sub>2</sub> při měření rozkladu vzorku PLA ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu .....	69
Obrázek 32 Produkce CO <sub>2</sub> při měření rozkladu polymerní směsi PVP/PLA (50/50) ve vodném prostředí s inokulem aerobního aktivovaného kalu.....	69
Obrázek 33 Produkce CO <sub>2</sub> při měření rozkladu polymerní směsi PVP/PLA/NMP ve vodném prostředí s inokulem z AK.....	69
Obrázek 34 Průběh rozpustnosti dle DOC jednotlivých druhů fólií v čase ve srovnání s hmotnostním úbytkem po 96 hodinách.....	71
Obrázek 35 Rozpustnost směsného polymeru PVP/PLA a PVP/PLA/kosubstrát dle DOC.....	72
Obrázek 36 Průběh nasákavosti $\delta$ [%] jednotlivých fólií v čase .....	73
Obrázek 37 Shrnutí výsledků testu nasákavosti jednotlivých fólií.....	74
Obrázek 38 SEM snímky povrchu fólií .....	75

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Základní informace o PVP <sup>10</sup> .....	12
Tabulka 2 Shrnutí dosavadních výsledků prací sledujících biologický rozklad PVP I .....	24
Tabulka 3 Shrnutí dosavadních výsledků prací sledujících biologický rozklad PVP II .....	25
Tabulka 4 Shrnutí výsledků prací zabývajících se vlivem vybraných kosubstrátů na biologický rozklad PVP .....	28
Tabulka 5 Vyhodnocení experimentálně stanoveného $CHSK_{Cr}$ pro samotné polymery a teoretické $CHSK_{Cr}$ pro polymerní směsi-fólie (dle navážek) .....	44
Tabulka 6 Parametry stanovené z průběhu křivek biologického rozkladu glukózy I .....	50
Tabulka 7 Vyhodnocení % degradace PVP v půdě adaptované na kosubstrát .....	56
Tabulka 8 Vyhodnocení mikrobiologického rozboru prováděného ze směsné půdy z „podzimního“ odběru zemědělské půdy a směsné půdy po „oživení“ mikrobiálních kultur .....	60
Tabulka 9 Stanovené parametry z průběhu křivek biologického rozkladu glukózy II .....	61
Tabulka 10 Vyhodnocení % degradace polymerních směsi PVP/PLA a směsí PVP/PLA/kosubstrát .....	64

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

<sup>1</sup>Definice půdy, 2014. Ministerstvo životního prostředí.  
[http://www.mzp.cz/cz/definice\\_pudy](http://www.mzp.cz/cz/definice_pudy) (accessed Oct 23, 2014)

<sup>2</sup>KUPEC, J. *Základy ekologie*. 2003. ISBN 80-7318-159-2.

<sup>3</sup>VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík: Humus - půda - rostlina (2) Humus a půda. *Biom.cz* [online]. 2006-11-14 [cit. 2014-10-23]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-2-humus-a-puda>>. ISSN: 1801-2655.

<sup>4</sup>JULINOVÁ, M., et al. Initiating Biodegradation of Polyvinylpyrrolidone in an Aqueous Aerobic Environment: Technical Note. *Proceedings of ECOpole*, 2013, vol. 20, no. 1, p. 199–208.

<sup>5</sup>Bezpečnostní list, 2014. Applichem.com.  
[http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A2258\\_cs\\_CZ.pdf](http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A2258_cs_CZ.pdf) (accessed July 06, 2014).

<sup>6</sup>KUPEC, J., et al. Biopolymery jako plniva v plastech. *Chem. Listy*, 2003, vol. 97, p. 155–159.

<sup>7</sup>VAŠKOVÁ, M. *Možnosti odstraňování polyvinylpyrrolidónu (PVP) biologickou cestou: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2011.

<sup>8</sup>ROBINSON, B., et al. *A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone*. Chelsea: Lewis Publishers, INC, 1990. ISBN 0-87371-288-9.

<sup>9</sup>MARUŠINCOVÁ, H. *Studie možností biologického odstraňování polyvinylpyrrolidónu analogy vinylpyrrolidónu: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2009.

<sup>10</sup>WYPYCH, G. *Handbook of polymers*. Kaada, 2011. 684 p. ISBN 978-1-895198-47-8.

<sup>11</sup>POLÁCHOVÁ, J. *Aditiva v potravinách: Bakalářská práce*. MU v Brně, 2013.

<sup>12</sup>Polyvinylpyrrolidone (PVP) for pharmaceutical applications. Harke Group.  
<http://www.harke.com/products/synthetic-polymers/polyvinylpyrrolidone-pvp-for-pharmaceutical-applications.html> (accessed Dec 05, 2014)

---

<sup>13</sup>RŮŽIČKA, Jan. Mikrobiologie pro technology životního prostředí. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Technologická fakulta ve Zlíně, 1999, 124 s. ISBN 8021413743

<sup>14</sup>GERYCH, P. *Biodegradace polyethylenu s prooxidanty: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2008.

<sup>15</sup>NIAOUNAKIS, M. *Biopolymers: Reuse, Rycycling, and Disposal*. 1st ed. 2013. ISBN 978-1-45573145-9.

<sup>16</sup>VASILE, C., et al. *Handbook of Polymer Blends and Composites*. 1st ed. 2003. ISBN 1-85957-303-7.

<sup>17</sup>ADINI, F.; HABART, J. Biologická stabilita, dynamický respirační index a jeho uplatnění v odpadové hospodářství, 2003. Biom.cz. <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/biologicka-stabilita-dynamicky-respiracni-index-a-jeho-uplatneni-v-odpadove-hospodarstvi> (accessed Feb 19, 2015).

<sup>18</sup>DRUŽBÍK, M. *Automatizovaný postup sledování biologického rozkladu polymerů (aplikace mikrorespirometru): Diplomová práce*. Zlín: UTB ve Zlíně, 2006.

<sup>19</sup>KOTASOVÁ, I. *Biodegradace směsných polymerů v termofilních podmínkách: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2006.

<sup>20</sup>PEKAŘOVÁ, S. *Iniciace biologického rozkladu polyvinylalkoholu v půdním prostředí: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2012.

<sup>21</sup>NĚMEČKOVÁ, T. *Ověření respirometru BI-2000 pro sledování biodegradace organických látek: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2008.

<sup>22</sup>ČERVENÁKOVÁ, L. *Předúprava polyvinylpyrrolidonu před biologickým rozkladem: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2010.

<sup>23</sup>VRLOVÁ, L. *Biodegradace polyvinylpyrrolidonu ve vodném anaerobním prostředí. diplomová práce: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2011..

<sup>24</sup>MĚRKOVÁ, M. *Biodegradace syntetických polymerů bakteriemi rodu Sphingomonas: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2014.

- 
- <sup>25</sup>VYORALOVÁ, M. *Předpoklady mikrobiálního rozkladu polyvinylpyrrolidonu: Diplomová práce*. UTB ve Zlíně, 2012
- <sup>26</sup>EUBELER, J. *Biodegradation of Synthetic Polymer in the Aquatic Environment: Disertační práce*. Universität Bremen, 2010.
- <sup>27</sup>MIKEŠ, J.; et al. Volba vhodného kosubstrátu jako klíčový krok k dosažení lepších výsledků při in-situ bioremediačních zákrocích, 2007. ESP biotechnologie. [http://www.epssro.cz/documents/konference\\_seminare/2007\\_10\\_16\\_001\\_clanek.pdf](http://www.epssro.cz/documents/konference_seminare/2007_10_16_001_clanek.pdf) (accessed Oct 15, 2014).
- <sup>28</sup>HIROKISHI, S., et al. Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions. *J. Photochem. Photobiol., A*, 2001, vol. 138, p. 69–77.
- <sup>29</sup>LORAINE, G., et al. Oxidation of Polyvinylpyrrolidone and Ethoxylate Surfactant in Phase-Inversion Wastewater. *Water Environ. Res.*, 2008, vol. 80, no. 4, p. 373–379.
- <sup>30</sup>GIROTO, J., et al. Oxidation of Polyvinylpyrrolidone and Ethoxylate Surfactant in Phase-Inversion Wastewater. *Chem. Eng. Process.*, 2008, vol. 47, no. 12, p. 2361–2369..
- <sup>31</sup>GHANEM, S., ABD EL-MOHDY, H., et al. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogel prepared by  $\gamma$ -irradiation. *Springer Science + Business Media B.V.*, 2008, vol. 16, p. 1–10.
- <sup>32</sup>ROY, S., et al. Biodegradation of PVP-CMC hydrogel film: a useful food packaging material. *Carbohydr. Polym.*, 2012, vol. 89, no. 2, p. 346–353.
- <sup>33</sup>SMITH, R. *Biodegradable polymers for industrial applications*. Woodhead Publishing Limited, 2000. ISBN 0-8493-3466-7.
- <sup>34</sup>PAPONG, S., et al. Comparative assessment of the environmental profile of PLA and PET drinking water bottles from a life cycle perspective. *JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION*, 2014, vol. 65, p. 539–550.
- <sup>35</sup>RUDEEKIT, Y., et al. Determining Biodegradability of Polylactic Acid under Different Environments. *J. Inst. Met.*, 2008, vol. 18, p. 83–87.

- 
- <sup>36</sup>YUTAKA, T., et al. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72, p. 244–251.
- <sup>37</sup>CHENG, H.N. a Richard A. GROSS. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*. Washington DC: American Chemical Society, 2010, s. 405-414. ISBN 978-0-8412-2581-7.
- <sup>38</sup>OKHITA, T. Thermal Degradation and Biodegradability of Poly (lactic acid)/Corn Starch Biocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, vol. 100, p. 3009–3017.
- <sup>39</sup>DE PAULA, E., et al. PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE BLENDA À BASE DE PDLLA E PVP. *Quim Nova*, 2012, vol. 35, no. 6, p. 1084–1089.
- <sup>40</sup>EL-HOUSSINY, A., et al. Biodegradable Blends Based on Polyvinylpyrrolidone for Insulation Purposes. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, vol. 124, p. 3879–3891.
- <sup>41</sup>LAHUTA, R. *Antibakteriální fólie na bázi vodorozpustných polymerů: Diplomová práce*. Zlín: UTB ve Zlíně, 2013.
- <sup>42</sup>LAHUTA, R. *Příprava a vlastnosti fólií z PVP: Bakalářská práce*. Zlín: UTB ve Zlíně, 2011.
- <sup>43</sup>EBERLI, D. *Tissue Engineering*. 2010. ISBN 978-953-307-079-7.
- <sup>44</sup>YONG, H., et al. Degradation and Degradation-Induced Re-Assembly of PVP-PCL Micelles. *Biomacromolecules*, 2010, vol. 11, no. 2, p. 481–488.
- <sup>45</sup>KIM, G., et al. Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.*, 2013, vol. 24, no. 6, p. 1425–1442.
- <sup>46</sup>HURST, G., et al. A facile in situ morphological characterization of smart genipin-crosslinked chitosan–poly(vinylpyrrolidone) hydrogels. *Journal of Materials Research*, 2013, vol. 28, no. 17, p. 2401–2408.
- <sup>47</sup>CHAO, Y. Preparation and Application of PEG/PVP Copolymers. *J. Environ. Polym. Degrad.*, 2012, vol. 21, p. 160–165.
- <sup>48</sup>SOROORY, H. Application of PDMS-based coating in drug delivery systems using PVP as channeling agent. *Iranian Polymer Journal*, 2013, vol. 22, no. 11, p. 791–797.
- <sup>49</sup>NEŠPOROVÁ, M. *Validace a optimalizace postupu odběrů, transportu a úpravy vzorků půd pro mikrobiální analýzy: Diplomová práce*. MUNI v Brně, 2008.